

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Perfil de aminoácidos plasmáticos y expresión génica de  
receptores de neurotransmisores tras la autoadministración  
de cocaína y alcohol en ratas**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Alberto Marcos Bermejo**

**Directores**

**Arturo Anadón Navarro**  
**Emiliano Ambrosio Flores**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Farmacología y Toxicología**



**TESIS DOCTORAL**

***Perfil de aminoácidos plasmáticos y expresión génica de  
receptores de neurotransmisores tras la autoadministración de  
cocaína y alcohol en ratas***

**Alberto Marcos Bermejo**

**Directores**

**Dr. Arturo Anadón Navarro**

**Departamento de Farmacología y Toxicología, UCM**

**Dr. Emilio Ambrosio Flores**

**Departamento de Psicobiología, UNED**





*Facultad de Veterinaria*  
*Departamento de Farmacología y Toxicología*

## **TESIS DOCTORAL**

*Perfil de aminoácidos plasmáticos y expresión génica de receptores de neurotransmisores tras la autoadministración de cocaína y alcohol en ratas”*

**Autor:**  
Alberto Marcos Bermejo

Director (Tutor): Dr. Arturo Anadón Navarro  
Departamento de Farmacología y Toxicología, UCM

Co-director: Dr. Emilio Ambrosio Flores  
Departamento de Psicobiología, UNED

Julio, 2019





Dr. **Arturo Anadón Navarro**, catedrático del Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y Dr. **Emilio Ambrosio Flores**, Catedrático de Psicobiología de la Universidad Nacional de Educación a Distancia de Madrid.

**CERTIFICAN:**

Don Alberto Marcos Bermejo con DNI 3448537-D, estudiante de Doctorado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos experimentales por los cuales se ha completado la presente Tesis Doctoral titulada: ***“Perfil de aminoácidos plasmáticos y expresión génica de receptores de neurotransmisores tras la autoadministración de cocaína y alcohol en ratas”***

Considerando que tanto el contenido científico como la presentación de la misma, reúnen las condiciones necesarias para su defensa y opción al grado de doctor.

Y para que conste ante quien proceda, firmamos el presente certificado en Madrid,

Julio de 2019

Fdo. **Arturo Anadón Navarro**

Fdo. **Emilio Ambrosio Flores**



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Alberto Marcos Bermejo,  
estudiante en el Programa de Doctorado Veterinaria,  
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Perfil de aminoácidos plasmáticos y expresión génica de receptores de neurotransmisores tras la autoadministración de cocaína y alcohol en ratas

y dirigida por: Dr. Arturo Anadón Navarro y Dr. Emilio Ambrosio Flores

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 3 de julio de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



## **AGRADECIMIENTOS:**

Mi sincero agradecimiento por su ayuda en esta empresa:

A mis directores, Emilio Ambrosio y Arturo Anadón, por su ejemplo, por animar, su continuo apoyo y, en general, por hacer posible las cosas.

A Antonio Crego y Elena Sánchez de la Universidad de Alcalá por su profesionalidad y buen hacer.

A Inmaculada Ballesteros y Alberto del Castillo de la Universidad de Castilla-La Mancha.

A Alejandro Higuera, por su imperecedera disponibilidad para prestar cualquier tipo de ayuda.

A Rosa Martínez-Larrañaga, José Luis Rodríguez, Irma, Arantxa, Bernardo y en general a todo el grupo de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la UCM.

A Ana de Paz, por batallar incansablemente con los datos.

A Marcos Ucha, David Roura, Mario Moreno, Javier Orihuel, Roberto Capellán, Lidia Blázquez, Ana Joya, Raquel Santos, Shishir Baliyan, Santiago Morales, Mónica Fernández, Héctor Pastor..... por su continuada ayuda en el no siempre fácil, trabajo de laboratorio.

A mis compañeros, técnicos del laboratorio: Rosa Ferrado que realiza la cirugía y hace posible todo lo que viene detrás, Luis Carrillo, Luis Troca, Gonzalo y Ana que dan vida y sentido al laboratorio. Al personal que atiende el animalario (Pilar, Mariano y Telmo).

A María, administrativo del Departamento de Psicobiología, sin cuyo buen hacer todo sería más difícil.

A los profesores del Departamento de Psicobiología de la UNED.

Al personal de las contratas de la UNED de limpieza (Nieves, Gloria, Nuria....) y vigilancia (Ángel, Paco, Adolfo, Armando....)

No menos importantes, mis hermanos Ángel y José M<sup>a</sup>, mi cuñada Ana, mis sobrinas Andrea y Claudia y mi familia política Pablo, Inés (*in memorian*), Juani, Paco, Laura, Javi y la pequeña Alba.

A mis padres, que trabajaron para que la generación de sus hijos tuviera oportunidades que ellos no tuvieron.

A María y Alberto, por su incondicional apoyo, aunque algunas veces fue a costa de estar menos tiempo los tres juntos.

**Este trabajo ha podido ser realizado gracias al aporte de financiación de los siguientes proyectos:**

Red de Trastornos Adictivos (RTA-RD16/020/0022), Instituto de Salud Carlos III

Plan Nacional sobre Drogas (2016I-073), Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social

Ministerio de Ciencia e Innovación (PSI2016-80541-P)

Unión Europea (JUST/2013/DPIP/AG/4823-EU MADNESS)

# Índice

<b>I. Abreviaturas .....</b>	<b>17</b>
<b>II. Índice de tablas y figuras .....</b>	<b>19</b>
<b>III. Resumen.....</b>	<b>22</b>
<b>IV. Abstract.....</b>	<b>25</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>1.1. Consecuencias del consumo de cocaína y alcohol .....</b>	<b>31</b>
1.1.1. Prevalencia del consumo de cocaína.....	31
1.1.2. Prevalencia del consumo de alcohol .....	32
1.1.3. Policonsumo de cocaína y alcohol.....	33
1.1.4. Problemas de salud por el consumo de cocaína y/o alcohol.....	35
1.1.4.1 Problemas derivados del consumo de cocaína.....	35
1.1.4.2. Problemas derivados del consumo de alcohol .....	37
1.1.4.3. Problemas de salud agravados por el consumo simultáneo de cocaína y alcohol .....	38
<b>1.2. Adicción a cocaína y/o alcohol .....</b>	<b>41</b>
1.2.1. Adicción a drogas.....	41
1.2.2. Edad y sexo como factores que influyen en la adicción.....	42
1.2.3. Adicción a cocaína .....	44
1.2.4. Adicción al alcohol.....	45
1.2.5. Sinergia adictiva cocaína-alcohol .....	47
<b>1.3. Interacción toxicocinética cocaína-alcohol.....</b>	<b>49</b>
1.3.1. Toxicocinética del alcohol .....	49
1.3.2. Toxicocinética de la cocaína .....	50
1.3.3. Interacciones toxicocinéticas alcohol-cocaína .....	53
<b>1.4. Modelos animales de consumo y adicción a drogas.....</b>	<b>55</b>
1.4.1. Modelos de administración pasiva de drogas .....	56
1.4.1.1. Condicionamiento de preferencia al lugar .....	56
1.4.2. Modelos de autoadministración de drogas .....	56

1.4.2.1. Modelos operantes de autoadministración .....	56
1.4.2.2. Autoadministración intravenosa .....	57
1.4.3. Modelos no operantes de autoadministración.....	57
1.4.4. Modelos animales para el estudio del consumo de alcohol .....	58
1.4.4.1. Sistema de dos botellas.....	58
1.4.5. Modelos de policonsumo de cocaína y alcohol .....	59
<b>1.5. Sistemas de neurotransmisión.....</b>	<b>61</b>
1.5.1. Sistema dopaminérgico.....	61
1.5.2. Sistema GABAérgico .....	64
1.5.3. Sistema glutamatérgico.....	66
1.5.4. Sistema endocannabinoide.....	68
1.5.5. Proteínas asociadas a sinapsis.....	71
1.5.5.1 Gefirina .....	71
1.5.2.2. PSD-95 .....	72
<b>1.6. Biomarcadores y consumo de cocaína y/o alcohol .....</b>	<b>74</b>
1.6.1. Tipos de biomarcadores .....	72
1.6.2. La Metabolómica como herramienta de búsqueda de biomarcadores .....	75
1.6.3. Biomarcadores y drogas de abuso .....	76
1.6.3.1. Cocaína.....	77
1.6.3.2. Alcohol.....	79
1.6.3.3. Cocaína y alcohol.....	80
1.6.3.4. Aminoácidos libres en plasma como biomarcadores en el SNC .....	81
<b>2. Planteamientos de la investigación.....</b>	<b>85</b>
2.1. Hipótesis .....	87
2.2. Objetivos .....	88
2.2.1. Objetivos del Estudio .....	88
2.2.2. Objetivos del Estudio II .....	88
2.2.3. Objetivos del Estudio III.....	89
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>91</b>
<b>3.1. Diseño experimental general.....</b>	<b>93</b>
3.1.1. Estudio I .....	93

3.1.2. Estudio II .....	94
3.1.3. Estudio III .....	95
<b>3.2. Elección de las dosis empleadas .....</b>	<b>97</b>
<b>3.3. Desarrollo del Estudio I .....</b>	<b>98</b>
3.3.1. Animales.....	98
3.3.2. Implantación del catéter .....	98
3.3.3. Preparación de los tratamientos .....	99
3.3.4. Administración pasiva de los tratamientos.....	100
3.3.5. Extracción de las muestras .....	101
3.3.6. Determinación de alcohol en plasma.....	101
3.3.7. Cuantificación de L-Phe y L-Tyr (CE/MS) .....	101
3.3.8. Electroforesis capilar-LIF .....	102
3.3.9. Análisis estadístico.....	103
<b>3.4. Desarrollo del Estudio II.....</b>	<b>104</b>
3.4.1. Animales y procedimientos generales.....	104
3.4.2. Obtención de muestras.....	105
3.4.3. Obtención del perfil de metabolitos de cocaína.....	105
3.4.4. Determinación de proteínas y expresión génica .....	106
3.4.4.1. Procesamiento de muestras.....	106
3.4.5. Cuantificación de aminoácidos plasmáticos .....	109
3.4.6. Análisis estadístico.....	111
3.4.6.1. Proteína y expresión génica de subtipos de receptores .....	111
3.4.6.2. Análisis factorial exploratorio.....	111
3.4.6.3. ANOVA factorial de los aminoácidos plasmáticos.....	112
<b>3.5. Desarrollo del Estudio III .....</b>	<b>113</b>
3.5.1. Animales.....	113
3.5.2. Autoadministración intravenosa de drogas.....	113
3.5.3. Automoldeado de la conducta operante de presión de palanca.....	114
3.5.4. Perfil de aminoácidos plasmáticos .....	114
3.5.5. Análisis estadístico.....	115
<b>4. Resultados.....</b>	<b>119</b>

<b>4.1. Resultados del Estudio I.....</b>	<b>121</b>
4.1.1. Niveles de alcohol en plasma .....	121
4.1.2. Aminoácidos plasmáticos.....	122
4.1.3. Ratio L-Tyr/L-Phe .....	123
4.1.4. Ratio L-Glu+L-Asp/Gly+Tau .....	123
4.1.5. Ratio Gly/Tau.....	124
 <b>4.2. Resultados del Estudio II .....</b>	 <b>126</b>
4.2.1. Proteínas sinápticas: gefirina y PSD-95 .....	126
4.2.1.1. Gefirina.....	127
4.2.1.2. PSD-95.....	127
4.2.1.3. PSD-95/gefirina.....	127
4.2.2. Expresión génica de receptores .....	128
4.2.2.1. Receptor NMDA, subunidades R1, 2A y 2B .....	128
4.2.2.2. Receptor AMPA, subunidades 1 y 2 .....	130
4.2.2.3. Receptor GABA, Subunidades alfa 1, 2, gamma y delta .....	132
4.2.2.4. Sistema endocannabinoide .....	136
4.2.2.5. Beta actina .....	139
4.2.3. Perfil de metabolitos de cocaína en plasma .....	139
4.2.4. Perfil de aminoácidos libres en plasma .....	141
4.2.4.1. Análisis factorial univariado.....	141
4.2.4.2. Análisis multivariado (factorial exploratorio).....	149
 <b>4.3. Resultados Estudio III.....</b>	 <b>152</b>
4.3.1. Estudio conductual.....	152
4.3.1.1. Adquisición de la conducta de autoadministración.....	152
4.3.1.2. Mantenimiento de la conducta de autoadministración .....	153
4.3.2. Optimización de las condiciones de análisis L-Tyr, L-Phe y L-Val.....	154
4.3.3. Perfil plasmático de aminoácidos.....	155
4.3.3.1. L-Tyr.....	156
4.3.3.2. Ratio Tyr/Phe .....	157
4.3.3.3. Ratio BCAA/Tyr .....	158
 <b>5. Discusión.....</b>	 <b>163</b>
 5.1. Discusión del Estudio I .....	 165
5.2. Discusión del Estudio II.....	169
5.3. Discusión del Estudio III .....	179

<b>5.4. Discusión global.....</b>	<b>184</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>189</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>193</b>





## I. Abreviaturas

---

- **2-AG:** ácido araquidónico
- **5-HT:** 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina
- **AA:** aminoácido/s
- **AAA:** aminoácidos aromáticos
- **ADH:** alcohol deshidrogenasa
- **AEA:** anandamida
- **Ala:** alanina
- **ALT:** alanina aminotransferasa
- **Arg:** arginina
- **ASP:** aspartato aminotransferasa
- **AMPA:** receptor del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
- **APA:** American Psychiatric Association
- **ASP:** aspartato
- **ATV:** área tegmental ventral
- **AUC:** área bajo la curva
- **BCAA:** aminoácidos de cadena ramificada
- **CE:** Cocaetileno
- **cDNA:** DNA complementario
- **COGA:** Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism
- **C<sub>max</sub>:** concentración máxima en plasma
- **CPF:** corteza prefrontal
- **CPFm:** corteza prefrontal medial
- **CPL:** condicionamiento de preferencia al lugar
- **CRH:** hormona liberadora de corticotropina
- **DA:** dopamina
- **DE:** desviación estándar
- **DSM:** Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association
- **EC:** electroforesis capilar
- **eCB:** endocannabinoide
- **EEM:** error estándar de la media
- **FAAH:** amido hidrolasa de ácidos grasos
- **GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- **Gln:** glutamina
- **Gly:** glicina
- **Glu:** glutamato
- **Iso:** isoleucina
- **L-dopa:** hidroxifenilalanina
- **Leu:** leucina
- **LIF:** fluorescencia inducida por láser

- **MAGL:** Monoacil glicerol lipasa
- **MEOS:** sistema microsomal de oxidación
- **NA:** noradrenalina
- **NAc:** núcleo accumbens
- **NAD:** nicotinamida-adenina-dinucleótido
- **NAPE:** N-acil-fosfatiletanolamina
- **NAPE-PLD:** N-acil-fosfatiletanolamina- fosfolipasa D
- **NMDA:** N-metil-D-aspartato
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **Orn:** ornitina
- **Phe:** fenilalanina
- **PSD:** densidad postsináptica
- **Ratas-P:** alcohol-preferring rats
- **RNAm:** RNA mensajero
- **RT:** temperatura ambiente
- **SEM:** error estándar de la media
- **Ser:** serina
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **Tau:** taurina
- **TDH:** Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
- **TH:** tirosina hidroxilasa
- **Thr:** treonina
- **Tyr:** tirosina
- **ULS:** mínimos cuadrados no ponderados
- **Val:** valina

## II. Índice de tablas y figuras

### FIGURAS

---

**Figura 1.** Evolución del consumo de alcohol en España

**Figura 2.** Prevalencia de consumo combinado de diferentes sustancias psicoactivas

**Figura 3.** Vía de metabolización del alcohol

**Figura 4.** Metabolitos principales de la cocaína

**Figura 5.** Acciones de las diferentes drogas de abuso sobre el circuito cerebral de recompensa

**Figura 6.** Efecto de las drogas sobre los distintos tipos de receptores glutamatérgicos

**Figura 7.** Mecanismo de desactivación de endocannabinoides

**Figura 8.** Organización de las sinapsis inhibitorias GABAérgicas

**Figura 9.** Potencialidades de los biomarcadores según el curso de la patología

**Figura 10.** Proceso de estudio metabolómico

**Figura 11.** Diseño experimental Estuio I

**Figura 12.** Diseño experimental Estuio II

**Figura 13.** Diseño experimental Estuio III

**Figura 14.** Caja de condicionamiento operante

**Figura 15.** Secciones coronales de las regiones cerebrales recogidas

**Figura 16.** Unión aminoácido-Fluoróforo

**Figura 17.** Recta de calibrado

**Figura 18.** Electroferograma representativo

**Figura 19.** Concentración plasmática de etanol

**Figura 20.** Electroferogramas L-Tyr y L-Phe

**Figura 21.** Gráfico de cajas con bigotes de los AA diferenciados

**Figura 22.** Gráfico de barras proteínas gefirina, PSD-95 y ratio PSD-95/gefirina

**Figura 23.** Niveles de ARNm de subunidades NMDA

**Figura 24.** Niveles de ARNm de subunidades AMPA

**Figura 25.** Niveles de ARNm de subunidades GABA

**Figura 26.** Niveles de ARNm de CB1

**Figura 27.** Niveles de ARNm de enzimas endocannabinoides

**Figura 28.** Niveles de ARNm del receptor beta de actina

**Figura 29.** Abundancia relativa metabolitos cocaína

**Figura 30.** Gráfico de cajas con bigotes de AA -1

**Figura 31.** Gráfico de cajas con bigotes de AA -2

**Figura 32.** Gráfico de cajas con bigotes de AA -3

**Figura 33.** Gráfico de factores rotados

**Figura 34.** Adquisición de la conducta de autoadministración

**Figura 35.** Mantenimiento de la conducta de autoadministración

**Figura 36.** Optimización de la separación de AA (L-Tyr, L-Phe y L-Val)

**Figura 37.** Gráfico de barras L-Tyr

**Figura 38.** Gráfico de barras ratio L-Tyr/L-Phe

## **TABLAS**

---

**Tabla I.** Dosis efectiva-50, cocaína y cocaetileno

**Tabla II.** Formas de consumo de cocaína

**Tabla III.** Farmacocinética de la cocaína

**Tabla IV.** Perfil de AA y ratios, Estudio I

**Tabla V.** Proetinas gefirina, PSD-95 y ratio PSD-95/gefirina

**Tabla VI.** Receptor NMDA R1

**Tabla VII.** Receptor NMDA 2a

**Tabla VIII.** Receptor AMPA 1

**Tabla IX.** Receptor AMPA 2

**Tabla X.** Receptor GABA<sub>A</sub> alfa2

**Tabla XI.** Receptor GABA<sub>A</sub> gamma 2

**Tabla XII.** Receptor GABA<sub>A</sub> delta

**Tabla XIII.** Receptor CB1

**Tabla XIV.** Expresión de enzimas relacionadas con endocannabinoides

**Tabla XV.** Receptores de actina

**Tabla XVI.** Metabolitos plasmáticos cocaína

**Tabla XVII.** Metabolitos plasmáticos cocaína en presencia de alcohol

**Tabla XVIII.** AA diferenciados por la exposición a cocaína

**Tabla XIX.** AA diferenciados por la exposición al alcohol

**Tabla XX.** AA diferenciados por efecto del factor sexo

**Tabla XXI.** AA diferenciados por efecto de la edad

**Tabla XXII.** Concentraciones de AA, Estudio III

**Tabla XXIII.** Ratios AA, Estudio III

### III. Resumen

#### ***Perfil de aminoácidos plasmáticos y expresión génica de receptores de neurotransmisores tras la autoadministración de cocaína y alcohol en ratas***

A pesar de la aparición constante de nuevas drogas de abuso y de los cambios en sus patrones de consumo, el uso simultáneo de cocaína (un éster de ácido benzoico y metilecgonina) y el alcohol (alcohol etílico) continúa siendo muy frecuente en países occidentales como España. La alta prevalencia de alcoholismo o el consumo excesivo de alcohol entre los consumidores de cocaína puede deberse a un intento de mitigar algunos síntomas negativos de la cocaína, como la ansiedad, y/o de aumentar otros efectos positivos e, incluso, deseados como la euforia o una mejor percepción del bienestar físico. Al igual que otras formas de policonsumo, el uso conjunto de cocaína y alcohol comienza frecuentemente durante el período de transición desde la adolescencia a la edad adulta y se asocia con importantes consecuencias para la salud.

Los estudios descritos en la presente Memoria de Tesis Doctoral se desarrollaron, cronológica y experimentalmente, en tres fases. En la primera (Estudio I) se llevaron a cabo experimentos piloto con ratas macho adultas de la cepa Wistar, que recibieron por vía intravenosa y de forma pasiva: cocaína (1 mg/kg de peso corporal por inyección), alcohol (133 mg/kg de peso corporal por inyección), cocaína+alcohol (1 mg/kg + 133 mg/kg de peso corporal por cada inyección, respectivamente) y suero salino. En esta primera fase, además de comprobar que no era tóxica la administración conjunta e intravenosa de cocaína y alcohol mantenida de forma crónica durante 21 días seguidos, se cuantificó un grupo de aminoácidos plasmáticos de gran interés fisiológico. En una segunda etapa (Estudio II), con una administración pasiva de los tratamientos igual a la de la primera fase, se incluyó en el diseño experimental a ratas machos y hembras en un periodo de su desarrollo equivalente al de jóvenes-adultos. Y, en la tercera fase (Estudio III), la exposición a las drogas se hizo en las mismas condiciones experimentales del Estudio II, pero empleando la metodología de la autoadministración intravenosa, por ser el mejor modelo animal que remeda la drogadicción en humanos y cuya aplicación al estudio del consumo conjunto de cocaína y alcohol es muy escasa en la literatura científica.

En el Estudio II, en muestras de plasma recogidas tras la finalización de la última sesión de administración, se cuantificaron once aminoácidos mediante electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (electroforesis capilar-LIF) y se obtuvo un perfil de los metabolitos propios del proceso metabólico de la cocaína y de los generados por la presencia conjunta de esta droga con el alcohol. Se extrajeron

también muestras de tejido procedente de cuatro regiones encefálicas de la vía dopaminérgica cerebral relacionada con los efectos reforzantes de las drogas: la corteza prefrontal medial, el núcleo accumbens, el hipocampo y la amígdala. En estas cuatro estructuras se determinó la expresión de genes que codifican diversas subunidades de receptores del neurotransmisor GABA, de glutamato (NMDA y AMPA) y de endocannabinoides (CB1). Además de la expresión del receptor CB1, se analizó la de enzimas relacionadas con la biosíntesis y degradación de endocannabinoides. Por otro lado, también se cuantificaron mediante Western blot dos proteínas de anclaje presentes en la sinapsis y relacionadas con receptores de GABA y NMDA, la gefirina y PSD-95, respectivamente.

En el tercer estudio se analizaron, en primer lugar, los patrones de adquisición y de mantenimiento de la conducta de autoadministración conjunta de cocaína y de alcohol, a fin de compararlos con los de autoadministración de cocaína sola. No se incluyó en este caso un grupo de alcohol solo, dadas las bajas tasas de respuestas y, en consecuencia de consumo, que se deduce de la literatura científica sobre la autoadministración intravenosa de alcohol solo. Como segundo objetivo se estudiaron los efectos que ese policonsumo pudiera tener sobre las concentraciones plasmáticas de catorce aminoácidos en los animales de ambos sexos.

Considerados en conjunto, los resultados de estos tres estudios sugieren que la administración crónica, intravenosa y conjunta de cocaína y alcohol, ya sea pasiva o voluntaria, no parece tener efectos tóxicos apreciables en ratas machos adultas y en machos y hembras de una edad equivalente a la etapa de jóvenes-adultos de los seres humanos. Cuando se analizó la adquisición de la conducta de autoadministración conjunta de ambas drogas, las ratas hembras aprendieron más rápidamente esa conducta en comparación con los machos. Al estudiar los niveles de aminoácidos plasmáticos, se encontró que había desequilibrios tanto si la administración crónica era de una sola de las dos drogas o de ambas conjuntamente. También se hallaron alteraciones en la expresión de genes que codifican subunidades de receptores de GABA y glutamato, así como en la de enzimas relacionadas con la biosíntesis y degradación de endocannabinoides. Igualmente, se encontraron modificaciones en los niveles de las proteínas de anclaje gefirina y PSD-95. Por otro lado, al examinar si había un patrón característico de posibles cambios en los niveles plasmáticos de los aminoácidos, se comprobó que en la proporción (o ratio) Tirosina/Fenilalanina había un efecto opuesto dependiendo de si la droga era cocaína (que disminuía el valor de esa proporción) o alcohol (que aumentaba dicho valor). También, parece que la concentración plasmática de tirosina libre pudiera ser un marcador de posibles

cambios más duraderos. Así, incluso después de 48 horas de lavado farmacológico, los niveles plasmáticos de este aminoácido de los animales expuestos a drogas, bien por sí solos o formando parte de ratios con otros aminoácidos, se mantienen alterados en comparación con los de animales controles. La disminución de los niveles de tirosina fue mayor en las ratas hembras que se autoadministraron conjuntamente cocaína y alcohol que en los machos. Globalmente, todos estos hallazgos sugieren que la exposición crónica y conjunta a cocaína y alcohol afecta a sistemas metabólicos y modifica el patrón de receptores GABAérgicos, glutamatérgicos y de endocannabinoides.



## IV. Abstract

### ***Plasma amino acid profile and gene expression of neurotransmitter receptors after cocaine and alcohol self-administration in rats***

Despite the constant appearance of new drugs of abuse and new consumption patterns, the combined use of cocaine and ethyl alcohol is a prevalent practice in Western countries, included Spain. In the present study, the polydrug use has been addressed by using an animal model of intravenous administration. Our work has been developed in three phases. In a first phase (Study I) a series of experiments were carried out with adult male Wistar rats, which received passively and intravenously: cocaine (1mg/kg body weight/injection); alcohol (133 mg/kg body weight/injection); cocaine plus alcohol (1 mg/kg body weight/injection + 133 mg/kg body weight/injection); and saline (0,9 % NaCl). After 21 days of this administration regimen, plasma levels of nine amino acids were quantified by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (capillary-LIF electrophoresis).

In a second stage (Study II) both male and female young-adult rats were studied under the same administration regimen of first phase. In this Second study, besides the plasma quantification of eleven amino acids by capillary-LIF electrophoresis, a profile of the metabolites of the metabolic process of combined cocaine and alcohol or that of cocaine alone was obtained through Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS) procedures. In addition, brain samples from medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, hippocampus and amygdala were extracted to analyze the mRNA expression of genes encoding several subunits of GABA, NMDA and AMPA receptors, as well as the expression of CB1 receptor and the expression of enzymes related to the biosynthesis and degradation of endocannabinoids. Moreover, two anchorage synaptic proteins, gephyrin and PSD-95 that are related to GABA and NMDA receptors were quantified by Western blot.

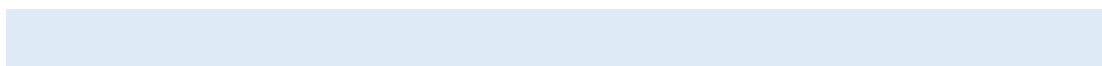
In the third phase (Study III), the procedure of intravenous self-administration behavior of combined cocaine and alcohol was established in young-adult male and female Wistar rats under the same experimental conditions of first and second phases. However, in this third study the alcohol alone group was not included, given the low response rates that were reported by the intravenous self-administration scientific literature. Behavioral parameters of acquisition and maintenance of combined cocaine and alcohol self-administration were analyzed in this third study, as well as the plasma concentration of fourteen amino acids.

Globally, the results of all these studies showed that intravenous passive or voluntary administration of combined cocaine and alcohol solution didn't have apparent toxic effects in adult male and young-adult male and female rats. In contrast, female exhibited a faster acquisition of intravenous self-administration behavior than male rats. Plasma amino acids imbalances were found after chronic exposure of cocaine alone, alcohol alone or the combination of both drugs. We also found changes in the gene expression of glutamatergic and GABAergic receptors, and in those of enzymes related to the cannabinoid system. It also was proven that the exposure to these two substances modified the levels of synaptic anchoring proteins gephyrin and PSD-95. Considering the plasma amino acids pattern of the three studies, the L-Tyr / L-Phe ratio showed an opposite effect after exposure to cocaine alone (a decrement) or to alcohol alone (an increment). However, tyrosine free in plasma seems to be a marker that reflects more permanent changes. Thus, even 48 hours after pharmacological washing, tyrosine levels by itself or related to other amino acids remained changed. The tyrosine depletion was deeper in the females that self-administered cocaine and alcohol combination than in males. All these findings suggest that chronic exposure to cocaine and alcohol affects metabolic systems and modifies the receptor pattern of GABAergic, glutamatergic and endocannabinoid neurotransmitter systems.





# 1. INTRODUCCIÓN





## 1.1. Consecuencias del consumo de cocaína y alcohol

La Organización Mundial para la Salud considera que "Droga", entendida como droga de abuso, es toda sustancia que, introducida en el organismo por cualquier vía de administración, produce una alteración del normal funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) del individuo y es, además, susceptible de crear dependencia, ya sea psicológica, física o ambas. Tanto la cocaína<sup>1</sup> (benzoil metil ecgonina) como el alcohol etílico o etanol<sup>2</sup>, en adelante alcohol, son dos sustancias que reúnen características suficientes para estar incluidas en dicha definición.

### 1.1.1. Prevalencia del consumo de cocaína

El consumo de drogas de abuso, legales o ilegales, sigue generando una amplia gama de problemas sociales y para la salud, con una especial incidencia en países del hemisferio occidental como España. Según el Informe Europeo sobre Drogas 2018 (Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2018), que informa sobre la prevalencia y otras variables relacionadas con el consumo de drogas en Europa, la cocaína es la droga estimulante ilegal más consumida. España, los Países Bajos y el Reino Unido son los países europeos más afectados, con una prevalencia del consumo de cocaína en los adultos jóvenes del 3 % o superior. España, Italia y el Reino Unido concentran el 74 % de todos los pacientes que inician tratamiento relacionado con la cocaína en Europa. Se estima que unos 2,4 millones de adultos jóvenes europeos de 15 a 34 años (el 1,9 % de este grupo de edad) consumieron cocaína en el último año. El contexto de consumo suele ser recreativo, siendo mayor en fines de semana y períodos vacacionales. La vía de consumo más frecuente es la intranasal (esnifada) (hidrocloruro de cocaína) y en menor medida la fumada (pasta base o crack) y la parenteral. Hay una clara diferencia entre consumidores integrados en la sociedad y consumidores marginales, que suelen combinar el consumo de cocaína con el de otras drogas ilegales, empleando con más frecuencia vías alternativas a la nasal en comparación con los consumidores más integrados socialmente.

---

<sup>1</sup> La cocaína es un alcaloide tropano cristalino que se obtiene del procesado de hojas de la planta de coca (*Erythrosylum coca*) originaria de Sudamérica, principalmente Perú y Bolivia, donde se consume de forma tradicional sin procesar. Es un estimulante del sistema nervioso con propiedades como la supresión del apetito o anestésico local.

<sup>2</sup> El etanol o alcohol etílico ( $C_2H_6O$ ) es el principal tipo de alcohol utilizado por sus propiedades psicoactivas y está presente en múltiples bebidas alcohólicas, con diferentes porcentajes. Es un líquido incoloro y volátil que se obtiene tradicionalmente por fermentación anaeróbica a partir de vegetales o subproductos vegetales ricos en azúcares en presencia de levaduras.

En España, según la última Encuesta sobre Alcohol y otras Drogas EDADES 2017 (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones), entre la población de 15 a 64 años la prevalencia del consumo de cocaína fue del 2,2 % en el último año, con un 10,3 % de los encuestados que afirmaba haberla consumido en algún momento de su vida. Según dicha encuesta 85.000 personas se iniciaron en el consumo de esta sustancia en 2017. Respecto al género, el 75 % de los consumidores son hombres y el 25 % mujeres. Por su parte, el Informe Europeo sobre Drogas 2018 (Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2018) indica que en España durante 2016 fueron admitidos a tratamiento por problemas con el consumo de esta sustancia 17.327 pacientes, de los cuales 8.445 lo fueron por primera vez. Atendiendo al género, el 86 % fueron hombres y el 14 % mujeres. La edad media del primer consumo fue de 21,1 años y la de la primera admisión a tratamiento 34,8 años.

### 1.1.2. Prevalencia del consumo de alcohol

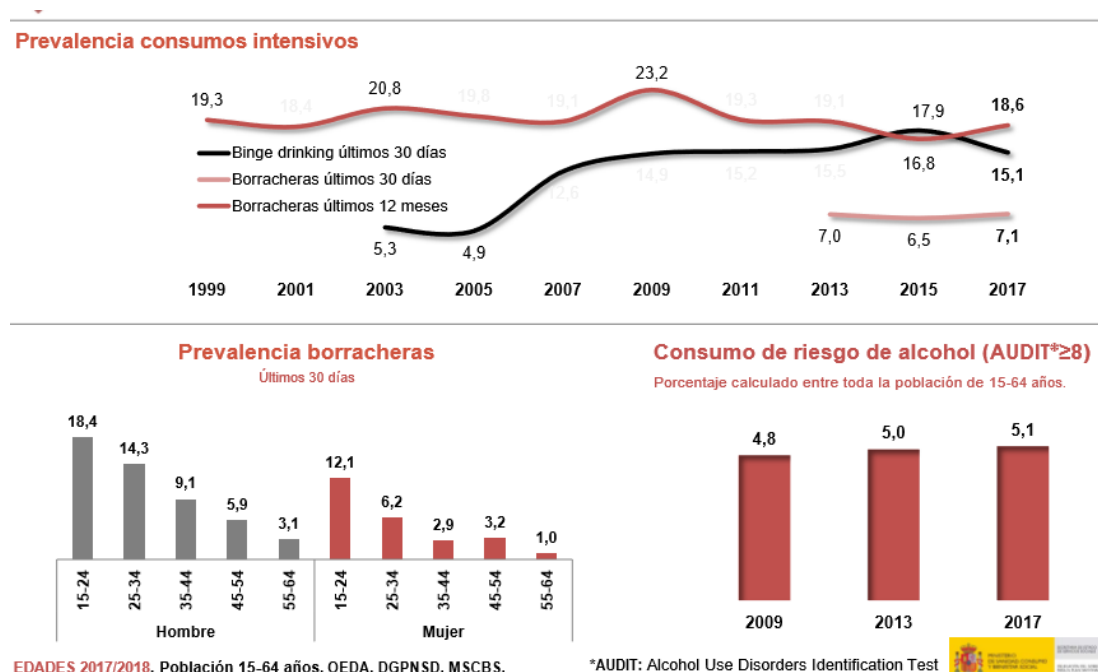
Según la Encuesta sobre Alcohol y otras Drogas en España (EDADES 2017, Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones), entre la población de 15 a 64 años, la prevalencia del consumo de alcohol en el último mes fue del 62,7 %, de los que un 7,4 % mantiene un consumo diario. Respecto al tipo de consumo, en los últimos treinta días el 5,1 % de la población de 15 a 64 años (aproximadamente 1.600.000 personas, entre las cuales 1.200.000 son hombres y 400.000 son mujeres) indica haber tenido un consumo de riesgo (ESCALA AUDIT  $\geq 8$ )<sup>3</sup>, valor que permanece estable desde 2009 (4,8 % en 2009 y 5,0 % en 2013). Además, el 18,6 % reconoce haberse emborrachado en el último año y el 7,1 % en el último mes.

Se considera consumo en atracón o “*binge drinking*” al hecho de consumir cinco o más bebidas alcohólicas en una misma ocasión en un intervalo de dos horas, para los hombres, y cuatro o más bebidas en mujeres. En 2017, el 15,1 % de la población de 15 a 64 años reconoció haber realizado esta práctica en los últimos 30 días (Figura 1). Este patrón de consumo, tan frecuente entre la población joven, da lugar a intoxicaciones agudas de gravedad, que incluso llegan al coma etílico.

---

<sup>3</sup> AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) es una prueba simple desarrollada por la Organización Mundial de la Salud para determinar si el consumo de alcohol de una persona puede considerarse peligroso. Este test es una escala profesional habitualmente utilizada en la práctica clínica para el diagnóstico de alcoholismo.





**Figura 1.** Evolución del consumo de alcohol en España en el periodo 1999-2017 (Fuente Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones).

Existen diferencias por sexo en el patrón de consumo, con un 10 % más de hombres consumidores que de mujeres. En la encuesta EDADES-2017 un 52 % de mujeres afirma haber consumido alcohol en el último mes, frente a un 71 % en el caso de los hombres. En cuanto a las intoxicaciones etílicas, los hombres de 15 a 34 años son el colectivo que registra un mayor número de borracheras, 37 % en el último año. Por su parte, en el grupo de mujeres de la misma edad un 22 % se ha emborrachado en el último año. Finalmente, en el grupo de 20 a 24 años es donde se registra una mayor prevalencia de consumo por atracón, un hecho que coincide con una menor percepción del riesgo ante el consumo de alcohol a esta edad.

### 1.1.3. Policonsumo de cocaína y alcohol

Entre los consumidores de drogas de abuso es una práctica muy generalizada el uso simultáneo de varias sustancias con propiedades psicoactivas. La Organización Mundial de la Salud define policonsumo como: “*el consumo de más de una sustancia o tipo de sustancias, simultáneo o no, que produzca dependencia de, al menos, una de ellas*”. El usuario de drogas de abuso puede que busque con esta práctica enriquecer la variedad de sensaciones, potenciar los efectos de una de ellas o compensar efectos adversos que una primera sustancia pudiera ocasionar.

	Alcohol	Tabaco	Hipnosedantes con o sin receta	Hipnosedantes sin receta	Cannabis	Cocaína en polvo	Cocaína base	Cocaína polvo y/o base	Éxtasis	Anfetaminas	Alucinógenos	Heroína	Inhalables volátiles	Nuevas sustancias
Alcohol	100,0	45,8	10,7	1,4	13,4	2,6	0,3	2,7	0,8	0,6	0,6	0,1	0,1	0,4
Tabaco	84,3	100,0	13,7	2,0	24,4	4,4	0,6	4,7	1,3	1,0	1,0	0,1	0,2	0,7
Hipnosedantes con o sin receta	73,1	50,5	100,0	11,6	13,9	5,2	0,9	5,7	1,5	1,3	1,1	0,3	0,2	1,1
Hipnosedantes sin receta	84,9	63,6	100,0	100,0	33,8	20,5	3,6	22,1	6,9	5,7	4,7	2,6	0,9	2,0
Cannabis	91,7	90,6	14,0	3,9	100,0	12,7	1,1	13,1	4,4	3,4	3,3	0,4	0,5	2,2
Cocaína polvo y/o base	94,4	87,3	28,9	13,0	65,8	92,9	13,0	100,0	19,9	15,4	11,7	2,5	1,4	8,1
Éxtasis	96,3	85,1	26,0	14,0	77,1	67,4	10,2	67,4	100,0	43,1	32,8	2,6	5,6	16,2
Anfetaminas	96,0	87,0	29,4	14,9	75,2	68,0	9,2	68,1	55,4	100,0	37,3	1,8	5,7	21,4
Alucinógenos	96,4	88,5	28,6	13,7	80,9	57,1	4,8	57,1	46,6	41,6	100,0	1,3	6,8	34,8

**Figura 2.** Prevalencia del consumo de diferentes sustancias psicoactivas en los últimos 12 meses, según la sustancia de coabuso, en España (Fuente: Edades 2017).

El alcohol y la cocaína son dos drogas que se consumen con frecuencia de forma simultánea, utilizando una para paliar o potenciar los efectos de la otra (Farré *et al.*, 1993; McCance-Katz *et al.* 1993). En este caso, el alcohol tendría, entre otros posibles efectos deseados, la función de moderar la “subida” de la cocaína y de la disforia asociada con la brusca desaparición de sus efectos. Según EDADES-2017 entre las personas de 15 a 64 años, el 2,5 % de los consumidores de alcohol lo son también de cocaína y el 96 % de los consumidores de cocaína también consumen alcohol (Figura 2).

El consumo simultáneo de varias drogas de abuso es muy prevalente entre la población general, por lo que es un gran motivo de preocupación en el grupo población adolescente. Aproximadamente un tercio de los adolescentes europeos, de 15 a 16 años de edad, declara haber consumido dos o más sustancias en los últimos 30 días (Emcdda and Espad, 2016; Olszewsky 2010). El alcohol está presente en la mayoría de los patrones de policonsumo de drogas, siendo la cocaína el estimulante más empleado. La combinación alcohol+cocaína es la elegida por el 7,8 % de los policonsumidores durante la misma noche. Otras combinaciones de tres o más drogas, que incluyen además de alcohol y cocaína, a éxtasis y/o cannabis son empleadas por otro 10 % de policonsumidores (Calafat, 1999). Entre los consumidores de cocaína es el grupo de jóvenes varones el que presenta un mayor riesgo de escalar hacia un

consumo múltiple de drogas, lo que sugiere que además de la edad el género puede ser un factor clave en esta conducta de riesgo (Kelly y Parsons, 2008).

#### **1.1.4. Problemas de salud derivados del consumo de cocaína y/o alcohol**

##### **1.1.4.1. Problemas derivados del consumo de cocaína**

El consumo de cocaína desencadena problemas para la salud, tanto agudos como en forma de complicaciones crónicas. Destacan los efectos derivados de la vasoconstricción, la hiperpirexia, el aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, cefaleas o problemas gastrointestinales, entre otros. (Longo *et al.*, 2012). La cocaína inhibe los procesos de recaptación de dopamina (DA), serotonina (5HT) y noradrenalina (NA) en la hendidura sináptica hacia el terminal presináptico, con lo que produce un aumento de estos neurotransmisores y, con ello, una mayor disponibilidad de éstos para los receptores postsinápticos (Rothman y Baumann, 2003). El exceso de noradrenalina es el responsable de muchos efectos adversos, tales como el aumento de la presión arterial, la sudoración o la midriasis.

Se producen con frecuencia problemas agudos graves como los cardiovasculares (angina de pecho, infarto agudo de miocardio, arritmias ventriculares) o cerebrovasculares (accidentes cerebrovasculares, convulsiones tónico-clónicas). En ocasiones, algunas de estas complicaciones pueden conllevar la muerte del consumidor, por un fallo cardíaco o respiratorio (Longo *et al.*, 2012). Los usuarios de cocaína muestran un diámetro de sus coronarias entre un 4 % y un 29 % inferior a la población no consumidora (Benzaquen *et al.*, 2001). A través de su acción sobre la noradrenalina, se interrumpe el balance entre la endotelina-1 y el óxido nítrico (NO), con el resultado de un menor flujo hacia el miocardio, aumentando así el riesgo de infarto (Phillips *et al.*, 2009).

La cocaína es igualmente un importante agente tóxico para el hígado donde es metabolizada por colinesterasas plasmáticas y hepáticas. Una parte minoritaria sigue una vía oxidativa microsómica hepática, que conduce a la aparición de metabolitos reactivos que pueden actuar como radicales libres. Las lesiones hepáticas agudas tóxicas son de tipo citolítico. En voluntarios consumidores de cocaína, respecto a los no consumidores, se ha observado una mayor prevalencia en mantener niveles altos

de las enzimas hepáticas ALT y AST (Cantínela *et al.* 2007). En concreto, un 94 % de los sujetos consumidores de cocaína mantenía altos los niveles de ALT y AST frente a un 37,5 % de la población no consumidora.

Después de los problemas respiratorios, como infecciones pulmonares e hiperreactividad bronquial, las complicaciones psiquiátricas son la principal causa de ingreso hospitalario en consumidores de cocaína, siendo el trastorno psicótico agudo por drogas, el síndrome depresivo y el intento de autolisis las causas principales (Sopeña *et al.*, 2008). Otros problemas psiquiátricos, trastornos o episodios, indicados en el DSM-5 (APA, 2014) por el consumo de cocaína son: intoxicación por cocaína, intoxicación por cocaína con alteraciones perceptivas, delirium por intoxicación por cocaína o el trastorno de ansiedad inducido por cocaína. Son también frecuentes los cuadros psicóticos por consumo de cocaína, que pueden manifestarse, entre otros síntomas, con agitación y agresividad. En las intoxicaciones graves aparecen episodios con brotes de ideas paranoides, estado de confusión y crisis de pánico. Los síntomas de estos episodios psicóticos tienen manifestaciones parecidas a algunas de las que sufren los pacientes diagnosticados con esquizofrenia (Blanco y Sirvent, 2006).

En el Sistema Nervioso Central (SNC) la cocaína, por medio de su acción sobre los sistemas monoaminérgicos presentes en el circuito neural de recompensa mesocorticolímbico, facilita el desarrollo de trastornos adictivos. Su consumo crónico promueve cambios neuroquímicos que redundan en la alteración de la expresión de genes y proteínas de diversas estructuras cerebrales relacionadas con procesos como la abstinencia, la recaída o el ansia por consumir (*craving*)<sup>4</sup> (Koob y Volkow, 2010).

Según la vía de administración pueden aparecer otros problemas específicos (Revisado por Lizasoain, 2002):

- Inhalación (de pasta o base de coca): infección pulmonar, pérdida del olfato, epistaxis, disfonía, problemas de secreción nasal o pulmón de crack.
- La ingesta puede ocasionar isquemia o necrosis intestinal debida a la reducción del flujo sanguíneo.
- Con la administración intravenosa se han descrito casos de paradas respiratorias.

---

<sup>4</sup> *Craving* es un concepto cuyo origen está en el término inglés "crave": que significa ansiar o anhelar. *Craving* es el ansia por consumir drogas.

#### 1.1.4.2. Problemas derivados del consumo de alcohol

Las alteraciones neurológicas, cardiovasculares, hepatitis, problemas gestacionales y cáncer son algunos de los problemas de salud más graves para la salud que un consumo continuado de alcohol puede ocasionar.

Las tres lesiones hepáticas más importantes inducidas por el alcohol son: hígado graso alcohólico, hepatitis alcohólica y cirrosis alcohólica. Estas alteraciones no se suelen encontrar de forma aislada y cada paciente puede presentar una combinación variable de las tres. Los elementos determinantes para la lesión hepática son la cantidad, la duración en el consumo y el tipo de bebida. Un 10-15 % de alcohólicos desarrolla cirrosis y a ésta se le atribuye el 15 % de las muertes ocasionadas por el alcohol (Rehm, *et al.*, 2005). Las mujeres presentan lesión hepática con consumos menores de alcohol, lo que sugiere que las hormonas sexuales podrían influir sobre el daño oxidativo generado por el alcohol (Colantoni *et al.*, 2000). El hígado graso, presente en la mayoría de los alcohólicos, produce cambios reversibles y no es precursor de cirrosis ni de hepatitis alcohólica. En ésta, hay lesiones inflamatorias, infiltración de leucocitos y necrosis de hepatocitos con repercusión clínica variable, mientras que en la cirrosis se produce ya una fibrosis tisular irreversible.

El consumo crónico de alcohol induce alteraciones de tipo neurológico como la pérdida de sustancia blanca, degeneración y muerte neuronal y modificaciones en terminales nerviosas. Estos cambios son evidentes en áreas como la corteza prefrontal (CPF), el hipocampo, o el cerebelo, que son estructuras que afectan a funciones cognitivas, como la memoria o el control de movimientos, las cuales se ven alteradas por el alcoholismo (Fadda y Rosetti, 1998). Los deterioros en las funciones neurológicas más prevalentes entre los pacientes con dependencia alcohólica son: dificultad para resolver problemas abstractos, problemas en el aprendizaje visoespacial y verbal, los relacionados con la memoria o el deterioro en habilidades y funciones motoras (Harper y Matsumoto, 2005; Ravaglia, *et al.*, 2002).

En cuanto a los problemas neuropsiquiátricos ocasionados por el alcohol, el DSM V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 2014) describe 15 trastornos, algunos de tipo psicótico como los delirios por intoxicación y abstinencia y otros desórdenes. La demencia alcohólica se caracteriza por un deterioro cognitivo con una acentuada amnesia, que es de carácter crónico y progresivo, y que puede ir acompañada de otras patologías neurológicas como la neuropatía periférica o la encefalopatía de Wernicke-Korsakoff. En alcohólicos

crónicos es frecuente el denominado síndrome Wernicke-Korsakoff, que se produce por una deficiencia de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) y su suplementación en la dieta puede prevenir el mismo. La encefalopatía de Wernicke es la primera fase, siendo de carácter agudo y potencialmente reversible. El síndrome o psicosis de Korsakoff, crónico y estructural, es la fase amnésica del síndrome Wernicke-Korsakoff y produce una incapacidad para el aprendizaje de material nuevo, pero preservando la memoria remota por un daño estructural permanente en zonas del cerebro relacionadas con la memoria (Blanco y Sirvent, 2006).

#### **1.1.4.3. Problemas de salud agravados por el consumo simultáneo de cocaína y alcohol**

Algunas patologías se ven agravadas por el consumo simultáneo, respecto al individual, de cocaína o de alcohol. Entre éstas destacan el incremento de muerte súbita, convulsiones y la hepatopatía. Algunos de estos problemas están asociados a la aparición de un nuevo metabolito, el cocaetileno. El cocaetileno (CE), benzoilecgonina etil éster, es un metabolito que está presente solamente cuando concurren cocaína y alcohol en el organismo y que se ha asociado con convulsiones, cardiotoxicidad, daño hepático y problemas en el sistema inmunitario (Pennings *et al.* 2002). La hepatotoxicidad del CE proviene de su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno. A su vez, las especies reactivas del metabolismo oxidativo propio de la cocaína incrementan su generación con la administración de alcohol (Boelsterli, *et al.*, 1993).

Afecta, también, a la contractilidad del miocardio en mayor medida que la cocaína (Qiu y Morgan, 1993). El CE se comporta como un potente bloqueador de los canales de sodio en el miocardio, agravando la cardiotoxicidad, en comparación con la generada por la cocaína o el alcohol por separado. Los efectos de la cocaína sobre el sistema cardiovascular son agravados por el alcohol mediante un incremento del ritmo cardíaco (Farré *et al.*, 1993; McCance-Katz *et al.*, 1993). Los usuarios de cocaína y alcohol que presentan enfermedades coronarias tienen un riesgo más de veinte veces superior de sufrir una muerte súbita, al de los usuarios de cocaína solamente (Randall, 1992). Tanto cocaína como CE han demostrado en ratones una similar capacidad para producir convulsiones, aunque el CE produce letalidad a una menor dosis (Tabla I) (Katz *et al.*, 1992). Por otro lado, las hembras parecen ser más sensibles a esta

molécula que los machos, ya que tienen dosis letal-50 inferiores (Schechter y Meehan, 1995).

**Tabla I.** Dosis efectiva-50 de la cocaína y del cocaetileno

<i>Droga</i>	<i>Estimulación</i>	<i>Convulsiones</i>	<i>Letalidad</i>
<b>Cocaína</b>	2,70 (1,52-3,87)	174,1 (162,2-186,8)	237,7 (214,0-264,1)
<b>Cocaetileno</b>	3,94 (3,45-4,44)	156,8 (140,5-174,9)	201,5 (193,5-209,7)
<b>Potencia relativa</b>	3,37 (2,13-8,32)	0,90 (0,79-1,03)	0,85 (0,76-0,95)

Dosis efectiva-50 ( $\mu\text{mol/kg}$ ) y potencia relativa para los efectos de: estimulación motora, convulsiones y letalidad en ratón Swiss-Webster. La potencia relativa queda definida como la dosis de cocaetileno que iguala los efectos de una dosis de cocaína de 1  $\mu\text{mol/kg}$ . Entre paréntesis figuran los valores del intervalo de confianza del 95%. Modificado de Katz *et al.* 1992.

A fin de comprobar el efecto tóxico aditivo del alcohol sobre el propio de la cocaína, se ha trabajado con diversos modelos en cultivos de hepatocitos expuestos a diferentes dosis de cocaína y alcohol etílico (Figliomeni y Abdel-Rahman, 1997). Mediante este modelo se comparó el efecto de adicionar alcohol, en concentraciones tóxicas para humanos (25 mM), a dos dosis de cocaína 1mM (no tóxica) y 5 mM (tóxica). Los resultados mostraron que la viabilidad de los cultivos se veía más afectada por la cocaína que por el alcohol y que, al medir la liberación de las enzimas ALT y AST, no se producía un aumento importante de la primera, mientras que la AST incluso bajaba con la adición de etanol. Por otro lado, estos mismos autores han comprobado que la liberación de LDH (lactato deshidrogenasa) al medio extracelular en cultivos de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con salino, fenobarbital y alcohol, demostró que un tratamiento posterior con alcohol y cocaína no supuso un aumento de la hepatotoxicidad añadida (Figliomeni y Abdel-Rahman, 1998).

Respecto a las posibles interacciones cocaína-alcohol, que pudieran incrementar sinérgicamente sus toxicidades individuales se han propuesto tres mecanismos (Figliomeni y Abdel-Rahman, 1998):

- Una inducción enzimática que acelere el mecanismo oxidativo de la cocaína.
- Una inhibición de la inactivación hidrolítica de la cocaína a benzoilecgonina, sustituyendo esta vía por un mecanismo de oxidación.
- La formación de metabolitos adicionales como el cocaetileno.

En relación a los problemas neuropsiquiátricos, aunque en algunos casos no se ha encontrado una mayor prevalencia de comorbilidad psiquiátrica entre los consumidores de ambas drogas respecto a su consumo individual (Pennings, *et al.*, 2002), otros trabajos si apoyan la idea de que hay una relación entre el abuso combinado de cocaína y de alcohol con una mayor incidencia de patologías psiquiátricas. Ésta tendría características propias y conllevaría un agravamiento de algunos problemas psicológicos y psiquiátricos (Carroll, *et al.*, 1993; Brady *et al.*, 1995). Entre los consumidores de cocaína, por ejemplo, el alcohol incrementa la probabilidad de experimentar una psicosis paranoide causada por cocaína y de incorporar otras sustancias adicionales al patrón de consumo (Brady *et al.*, 1995). Pacientes con dependencia a estas dos sustancias muestran con más frecuencia síntomas de depresión y ansiedad, en comparación a los que solamente muestran dependencia de la cocaína (Cunningham *et al.*, 1993). Existe información contradictoria sobre si este policonsumo aumenta las conductas violentas (Salloum *et al.*, 1996) pero sí existe una relación más comprobada que lo asocia con un mayor riesgo de intento de suicidio (Arias *et al.*, 2016; Roy, 2001).



## 1.2. Adicción a cocaína y/o alcohol

### 1.2.1. Adicción a drogas

La adicción a drogas es un trastorno crónico y recurrente que se caracteriza por la búsqueda y el consumo compulsivo de drogas, a pesar de sus consecuencias negativas. Se considera como un trastorno del Sistema Nervioso Central, pues éste se ve alterado en su estructura y funcionamiento durante el proceso de adicción.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define adicción a drogas de abuso como: *“Estado de intoxicación crónica y periódica originada por el consumo repetido de una droga, natural o sintética, caracterizado por: 1) Una compulsión a continuar consumiendo por cualquier medio. 2) Una tendencia al aumento de la dosis. 3) Una dependencia psíquica y generalmente física de sus efectos y 4) Consecuencias perjudiciales para el individuo y la sociedad.”*

En el proceso de adicción se podrían definir tres etapas: uso, abuso y dependencia. La primera etapa comprende los primeros contactos con la droga, sin afectar de una forma preocupante a la salud y entorno social del consumidor. Con el consumo continuado se puede llegar hasta la fase de abuso, donde ya se producen consecuencias negativas importantes que se reflejan en la salud y/o el entorno social del usuario. Poco a poco, el patrón de consumo varía hacia periodos más frecuentes y prolongados de pérdida de control. Por último, en la fase de dependencia hay un estado de pérdida de control en el consumo, que concurre con neuroadaptaciones y cambios fisiológicos más permanentes. La dependencia puede ser psicológica, física o una combinación de ambas. Esta etapa se caracteriza por la obsesión y compulsión para administrarse la droga.

Las sustancias psicoactivas con capacidad adictiva presentan características moleculares muy variadas, actuando sobre diversas estructuras del cerebro y en diferentes sistemas de receptores, pero mantienen algunas características comunes, como la activación de la considerada como la vía anatómica de recompensa, la vía mesocorticolímbica dopaminérgica. Sus principales estructuras son el área tegmental ventral (ATV), el núcleo accumbens (NAc), la amígdala, el hipotálamo, el hipocampo y la corteza prefrontal (CPF). La activación de este circuito de recompensa puede ser de una forma directa, como en el caso de los psicoestimulantes, que incrementan la actividad dopaminérgica en este circuito al inhibir su recaptación presináptica o bien

por mecanismos más indirectos, como en la exposición aguda al alcohol, estimulando la liberación de péptidos opioides en la ATV (Guerri, 2012; Gianoulakis, 2001).

Kalivas y Volkow (2005) plantearon el proceso adictivo en tres etapas. Una primera etapa que se caracteriza por los efectos agudos de la droga. El mecanismo se iniciaría por un aumento de la dopamina (DA) en el NAc con una sobreactivación del subtipo de receptor de dopamina D1 y continuaría con una serie de cambios genéticos de tipo temprano, como c-fos, que inducen o promueven plasticidad en un corto periodo de tiempo. En una segunda etapa, de transición a la adicción, tendrían especial protagonismo algunas proteínas de larga vida media como  $\Delta$ FosB, que es un regulador que participa en la modulación de los receptores AMPA de glutamato. Se producirían, además, alteraciones en el contenido y la función de las proteínas directamente involucradas en la transmisión dopaminérgica, como cambios que perduran unos días después de que se detenga la administración de la droga, en proteínas como la tirosina hidroxilasa o el transportador de dopamina. En la tercera etapa, se producirían los cambios celulares más permanentes, que redundarían en una mayor vulnerabilidad a sufrir recaídas, incluso pasado un periodo largo de tiempo. Por otra parte, el mantenimiento en abstinencia podría aumentar la sensibilización motora y de búsqueda de drogas, a la par que inducir cambios en la expresión de algunas proteínas, como las comentadas de la etapa anterior, pero ya con un carácter irreversible.

### **1.2.2. Edad y sexo como factores que influyen en la adicción**

Durante la adolescencia las drogas de abuso pueden alterar el desarrollo normal de los neurocircuitos involucrados en el control de los impulsos, con consecuencias sobre la vulnerabilidad a la adicción en la edad adulta (Chambers *et al.* 2003). Algunos estudios, tanto en humanos como en animales, sugieren que las especiales características de un cerebro en desarrollo pueden ser por sí mismas factores que predispongan en etapas posteriores a conductas de riesgo, incluyendo el consumo de alcohol y de otras drogas de abuso (Chambers *et al.*, 2003; Spear, 2000, 2002). Por lo tanto, esta vulnerabilidad durante la adolescencia podría estar, al menos en parte, determinada biológicamente. Las diferencias sexuales en la maduración del cerebro contribuirán posteriormente a las diferencias entre sexos en cada etapa del proceso adictivo, dando forma a fenotipos característicos (Spear, 2016).

Aunque los datos epidemiológicos indican, que para la mayoría de sustancias psicoactivas, los hombres son mayores consumidores, biológicamente parece que las mujeres son más vulnerables a los efectos reforzantes de la cocaína o del alcohol

(Lynch y Carroll, 2000). Las diferencias entre los sexos se manifiestan en todas las fases del proceso adictivo (adquisición, escalada, mantenimiento y recaída después de la abstinencia). En modelos animales, la etapa de adquisición de la conducta de autoadministración se considera como la transición entre un primer contacto con la droga, con una tasa de respuestas baja, hacia un uso más regular y con una tasa de respuestas más alta y estable (Campbell y Carroll, 2000). Las ratas hembra alcanzan tasas de adquisición de autoadministración de cocaína más rápidamente y muestran una escalada de consumo más pronunciada que las ratas macho (Lynch y Carroll 1999, Becker y Hu, 2008, Becker *et al.*, 2017). Las diferencias neurobiológicas entre machos y hembras en estructuras del sistema mesolímbico dopaminérgico del refuerzo, como el NAc o el cuerpo estriado dorsolateral (DLS), podrían ser el mecanismo que subyace a las diferencias entre sexos en las etapas de adquisición y escalada en la adicción (Becker *et al.*, 2017). Por ejemplo, existen diferencias en la neurotransmisión dopaminérgica, mostrando las hembras una mayor respuesta en el cuerpo estriado, donde se observa mayor densidad de receptores dopaminérgicos en hembras que en machos. Por otro lado, en las hembras la presencia de la droga produce con más facilidad la transición del control de la conducta desde NAc al estriado dorsolateral, iniciando así un comportamiento compulsivo en el consumo de la droga (Perry, *et al.*, 2016; Cummings *et al.*, 2014).

Aunque se ha sugerido que las hormonas ováricas contribuyen a los mecanismos de acción implicados en las diferencias entre sexos en la adicción, su efecto no está del todo claro. Por ejemplo, el estradiol afecta a la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína en las hembras (Cumminngs, *et al.*, 2014), pero una vez establecida ésta, pierde su papel como regulador de la conducta adictiva (Becker *et al.*, 2017). Por otro lado, se cree que la influencia de las hormonas ováricas es mayor en la autoadministración de cocaína que en la de alcohol (Roth *et al.*, 2004).

Las diferencias entre sexos, sólo se muestran en la adquisición de conductas de preferencia o de autoadministración de drogas, si no también se observan en otras etapas del proceso adictivo. Así, en los estudios revisados por Roth *et al.* (2004), en el caso de la cocaína parece que hay consenso en que las hembras de rata muestran una fase de mantenimiento de conducta de autoadministración y mayor tasa de respuestas y duración temporal que la de los machos. Los escasos estudios que hay sobre las recaídas, después de un periodo de abstinencia, van en la dirección de que hay un mayor número de respuestas en las ratas hembra para la obtención de una dosis de cocaína que en machos (Roth *et al.*, 2004).

Por otro lado, existen diferencias entre sexos en las variables farmacocinéticas de diversas drogas y se cree que las hormonas ováricas pueden contribuir a tal efecto (Roth *et al.*, 2004), siendo este otro posible mecanismo propuesto para explicar las diferencias conductuales. Por ejemplo, los niveles plasmáticos de metabolitos de la cocaína como ecgonina metil-éster y norcocaína están aumentados en hembras, mientras que la benzoilecgonina lo está en machos (Festa, 2004). En cuanto al alcohol, el metabolismo de primer paso es superior en hombres y el volumen de distribución es inferior en mujeres (Soldin y Mattison, 2009).

### 1.2.3. Adicción a cocaína

Como ya hemos indicado, la cocaína bloquea los procesos de recaptación de DA, 5-HT y NA, pero, además de por estas acciones los diferentes aspectos de la adicción a la cocaína se ven también influidos por las de otros sistemas de neurotransmisores como el GABAérgico, el endocannabinoide, acetilcolina o el factor liberador de corticotropina (CRF) (Shalev *et al.*, 2002).

A corto plazo, los efectos hedónicos inducidos por la cocaína se producen por una activación de la neurotransmisión de la vía mesocorticolímbica dopaminérgica. La sobreestimulación dopaminérgica resultante es la causante de la mayoría de los efectos reforzadores y de la activación motora de la cocaína. No obstante, parece que se requiere de la participación de otras monoaminas para explicar las propiedades como reforzador de esa droga. Por ejemplo, en ratones knockout (KO) del transportador de dopamina, la cocaína sigue manteniendo sus efectos reforzadores, que desaparecen en modelos doble KO DAT/SERT (transportador de dopamina/transportador de serotonina) (Hall *et al.*, 2004).

Las drogas psicoestimulantes como la cocaína son las que más directamente inciden sobre el sistema cerebral de recompensa mediante su activación dopaminérgica. La dopamina es liberada en el NAc por neuronas cuyos cuerpos celulares están en el ATV. Desde el ATV las proyecciones se dirigen, además de hacia el NAc, hacia la CPF, hipocampo, amígdala y tubérculo olfatorio entre otras (Koob y Le Moal, 2001; Rodríguez-Jiménez, 2006). Con el consumo crónico de cocaína, se ha observado un descenso en la disponibilidad de receptores de DA, que podría estar relacionado con un mecanismo de tolerancia (Volkow, *et al.*, 1990). La exposición prolongada también genera neuroadaptaciones que implican alteraciones en sinapsis glutamatérgicas presentes en el sistema mesocorticolímbico de recompensa, con cambios en la función de proteínas que regulan la neurotransmisión del glutamato pre

y postsináptica en estructuras como la ATV o el NAc (Kalivas, 2014). Como ejemplo de esto, mediante un modelo de recaída reincidente, se ha encontrado que la transmisión de glutamato en la proyección desde la CPF hacia el NAc desempeña una importante función (Kalivas, 2004). Las alteraciones duraderas en la transmisión de glutamato pre y postsináptica en el NAc pueden aumentar la relación señal-ruido de las vías aferentes excitatorias prefrontales. Estas alteraciones pueden ser permanentes y contribuir a explicar la recaída tras un periodo de tiempo en abstinencia.

El uso crónico de drogas como la cocaína provoca alteraciones en la expresión génica en la proyección mesocorticolímbica por medio de mecanismos de transcripción y epigenéticos. Uno de estos factores con capacidad de producir estas alternaciones es la proteína  $\Delta$ FosB, que tiene un contacto directo con el AMPc. Estos cambios en  $\Delta$ FosB en el sistema límbico son duraderos y se relacionan con la consolidación de la conducta adictiva y las recaídas (Nestler, 2005).

Se conoce que la autoadministración de cocaína seguida de su retirada induce incrementos, duraderos en el tiempo, de receptores de glutamato en el sistema mesocorticolímbico (Lu *et al.*, 2003). Las subunidades de receptores afectadas incluyen NR1 de NMDA en ATV y NAc y las subunidades GluR1 y GluR2 de AMPA en NAc.

#### 1.2.4. Adicción al alcohol

El alcohol ejerce numerosos efectos farmacológicos a través de su interacción con diversos sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores (GABA, glutamato, serotonina, opioide, glicina, etc.), generando los efectos característicos de su consumo agudo.

Como otras sustancias con capacidad de generar dependencia, el alcohol actúa sobre la vía mesocorticolímbica dopaminérgica (Gessa *et al.*, 1985). El papel del sistema dopaminérgico sobre los efectos reforzantes del alcohol se ha demostrado desde diversos enfoques experimentales. Por ejemplo, la autoadministración de alcohol se mantiene tras la microinyección de etanol en la ATV (Gatto *et al.*, 1994). Otro ejemplo es que la liberación de DA es dosis-dependiente en el NAc de animales que se autoadministran alcohol (Weiss *et al.*, 1993).

En este consumo agudo, el mecanismo principal de actuación del alcohol conlleva su interacción con el receptor GABA<sub>A</sub> y con el receptor NMDA del glutamato. El GABA aumenta su transmisión al verse estimulado, mientras que el glutamato

reduce su efecto excitador al verse inhibido (Nutt, 1999). El alcohol posee diversas propiedades reforzadoras que explicarían su potencial adictivo, entre las que se encuentran la liberación de péptidos opioides (Di Chiara, 1996) o la liberación indirecta de DA, así como las interacciones con los receptores nicotínicos (Ayesta, 2002).

El alcohol, interaccionando con el receptor GABA<sub>A</sub>, facilita la entrada de iones de cloro y genera una hiperpolarización de la membrana y, como consecuencia, un aumento de la acción inhibitoria que produce sedación y ausencia de coordinación motora, entre otros efectos (Lijequist y Engel, 1982). Por medio de agonistas y antagonistas GABAérgicos, se ha comprobado como se alteran algunos efectos del alcohol como la sedación. El agonista muscimol potencia sus propiedades sedativas, mientras que el antagonista picrotoxina reduce el efecto de sedación y aumenta la actividad locomotora (Lijequist y Engel, 1982).

La activación del sistema opioide endógeno después del consumo de alcohol es uno de los mecanismos neurobiológicos implicados en las propiedades reforzantes de esta droga. Se han encontrado péptidos opioides en regiones del sistema mesocorticolímbico involucradas en el comportamiento de búsqueda de alcohol (Mansour *et al.*, 1994). Los opioides endógenos desempeñan un papel clave en las propiedades gratificantes (adictivas) del etanol. Como sabemos, tres tipos de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ) son las dianas respectivas de los péptidos opioides principales ( $\beta$ -endorfina, encefalinas y dinorfinas, respectivamente). Por su parte, las propiedades reforzantes de los correspondientes ligandos sobre los receptores  $\mu$  y  $\delta$  se producen mediante la activación del sistema de recompensa mesocorticolímbico, desde la ATV a estructuras más rostrales como el NAc (Herz, 1997).

Por otra parte, se ha descrito que con el consumo prolongado de alcohol se producen neuroadaptaciones y neurodegeneración en los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, con implicaciones en la conducta adictiva (Fadda y Rosetti, 1998). Como es conocido, la disfunción serotoninérgica se asocia con estados negativos de ánimo, que pueden predisponer al consumo excesivo de alcohol. Por otro lado, la estimulación dopaminérgica puede afectar a las propiedades reforzadoras del alcohol. Cuando el consumo se cronifica, se produce una disminución, aunque reversible durante la abstinencia, en el transportador de dopamina en estructuras como el cuerpo estriado o el NAc y en la disponibilidad del receptor D2 (Djoume y Laerence, 2002). Otros autores han observado que, durante la abstinencia tras un consumo crónico de alcohol, la actividad dopaminérgica aparece disminuida en la ATV (Diana *et al.*, 1992) que se observa también en los niveles extracelulares de DA en el NAc (Weiss *et al.*, 1996). Esta hipofunción dopaminérgica derivada de la ingesta crónica de alcohol

lleva a un mantenimiento de la conducta de consumo como mecanismo compensatorio de la menor liberación de dopamina y, por tanto, contribuye al desarrollo de dependencia.

#### **1.2.5. Sinergia adictiva cocaína-alcohol**

La alta prevalencia de alcoholismo o de consumo excesivo de alcohol entre los consumidores de cocaína puede deberse a un intento de mitigar algunos de los síntomas clínicos agudos negativos de la cocaína, como la ansiedad, y/o mejorar otros efectos positivos, e incluso deseados, como una euforia más intensa o una mejor percepción del bienestar físico (Farré *et al.* 1993; McCance-Katz *et al.* 1993).

La combinación de cocaína y alcohol produce unos efectos subjetivos hedónicos más pronunciados que la cocaína sola, donde los consumidores afirman experimentar una sensación de bienestar más placentera (Farré, *et al.*, 1993). Ello podría sugerir que esta combinación sería más susceptible de abuso que la cocaína o el alcohol tomados de forma individual.

Hay estudios epidemiológicos que muestran que los pacientes que han recurrido a la consulta de un especialista por abuso de alcohol, frecuentemente han consumido cocaína en el último año y que una gran parte de los que inician una terapia por abuso de cocaína tienen, también, una dependencia del alcohol (Pennigs *et al.*, 2002). Además, pacientes abstinentes que desarrollaron una dependencia simultánea a la cocaína y al alcohol se mostraron más susceptibles a que el alcohol fuera el desencadenante de una recaída en el abuso de cocaína, en comparación con aquellos en los que su dependencia previa era únicamente a cocaína (McKay *et al.*, 1999). Por otro lado, en un estudio con noventa y ocho pacientes varones, en rehabilitación por abuso de cocaína, se encontró que el consumo de alcohol no tenía un efecto sobre la recaída en el consumo de cocaína de aquellos sujetos que anteriormente no eran dependientes del alcohol. Por el contrario, los sujetos con historial previo de consumo de alcohol tenían altas posibilidades de recaer en el consumo de cocaína después de ingerir alcohol (McKay *et al.*, 1999).

#### **Modelos animales**

Como ya hemos apuntado, el alcohol modifica la biotransformación de la cocaína, incrementando su concentración plasmática, que se aprecia en el área bajo la curva (AUC) y en su concentración máxima ( $C_{max}$ ), y generando cocaetileno (CE) (Farré *et al.*, 1993; Dean *et al.*, 1992; Perez-Reyes y Jeffcoat, 1992). Esta es una molécula

neuroológicamente activa que proporciona unos efectos similares de euforia y bienestar que la cocaína, solo que de forma más intensa y por períodos más prolongados. En modelos animales se ha comprobado que el CE es una molécula con capacidad para incrementar la actividad motora y patrones de conducta instrumental (Jatlow *et al.*, 1991, Katz *et al.*, 1992). Su potencia como reforzador, valorada en el condicionamiento de preferencia de lugar y en modelos de autoadministración, es comparable con la de la cocaína (Schechter, 1995; Jatlow *et al.*, 1991; Winger *et al.*, 2007). Además, alcohol y cocaína mantienen sinergias, que se traducen en un incremento de la actividad en las vías mesocorticolímbicas de la recompensa. Así, la liberación de dopamina se potencia por el alcohol (Di Chiara e Imperato, 1988; Weiss *et al.*, 1993) y en ratas tratadas conjuntamente con cocaína y alcohol aumentaron los niveles de dopamina extracelular en el NAc respecto a las que recibieron una única sustancia. (Lindholm *et al.*, 2001). Por otro lado, a bajas dosis el cocaetileno potencia, mediante un mecanismo serotoninérgico, la excitación inducida por alcohol en neuronas dopaminérgicas del ATV y, a altas dosis, inhibe la recaptación de dopamina (Bunney *et al.*, 2001).



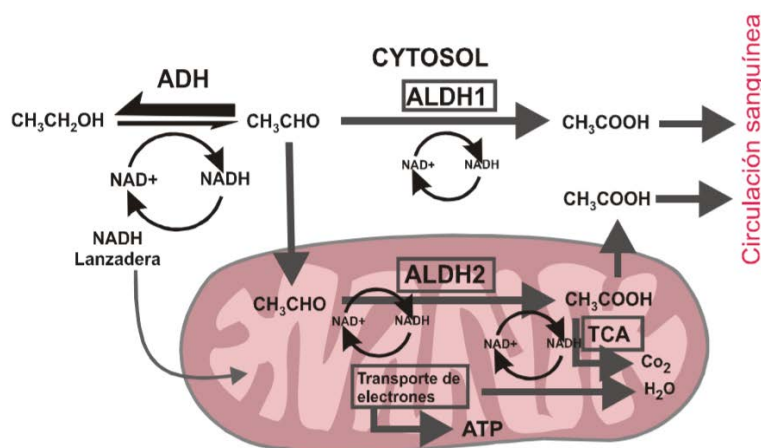
### 1.3. Interacción toxicocinética cocaína-alcohol

#### 1.3.1. Toxicocinética del alcohol

Tras el consumo de alcohol por vía oral, éste se absorbe en el tracto digestivo, sin verse afectado por variaciones de pH en sus distintos órganos. Tiene un componente de partición de 0.5 y se distribuye mejor en medios acuosos que lipídicos. Aunque accede al torrente sanguíneo desde la boca, el esófago, estómago o intestinos, su principal lugar de absorción es el intestino delgado. Algunos de los factores que alteran su absorción son: presencia de comida y tiempo de permanencia en el estómago, grado de concentración, diferencias genéticas en las enzimas o en la circulación sanguínea (Holford, 1997). También, hay diferencias entre sexos en el volumen de distribución, 0,7 L/kg para hombres y 0,6 L/kg para mujeres, que se atribuye a las diferencias genéticas en cuanto a la cantidad de grasa. El alcohol cruza sin dificultad las barreras placentaria y hematoencefálica y llega a los pulmones con facilidad desde el torrente sanguíneo (Aragón *et al.*, 2002).

El alcohol se metaboliza principalmente por una reacción oxidativa transformándose en acetaldehído. Este proceso tiene lugar mayoritariamente en el hígado. La principal vía metabólica de oxidación del alcohol radica en el citosol, mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Esta enzima cataliza la transformación reversible del alcohol a aldehídos y cetonas empleando NAD (Nicotinamida-adenina-dinucleótido) como cofactor (Figura 3). El acetaldehído producido se transforma en el citosol y en la mitocondria por la enzima aldehído deshidrogenasa en acetato. Estos dos procesos requieren del cofactor NAD, generándose la forma reducida de NADH.

Existen dos sistemas enzimáticos alternativos al ADH que actúan principalmente cuando hay un consumo excesivo o prolongado en el tiempo. Uno es el llamado sistema microsomal de oxidación del alcohol (MEOS) (Lieber y DeCarli, 1968) que actúa en el retículo endoplásmico liso. Una enzima importante de este sistema es la P450 CYP2E1, la cual desempeña un papel principal en la tolerancia metabólica al alcohol. La contribución del MEOS a la metabolización del alcohol es menor del 10%, pero tras una exposición crónica estos valores pueden elevarse hasta al 22% (Song y Cederbaum, 1996).



**Figura 3.** Esquema de la principal vía de metabolización del alcohol por medio de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa.

El otro sistema es el de la catalasa ( $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidoreductasa), la cual teniendo como función primaria degradar el peróxido de hidrógeno, con fines protectores para la célula, también tiene un papel en la oxidación del alcohol (Keilin y Hartree, 1945). En presencia de peróxido de hidrógeno, la catalasa cataliza la oxidación del alcohol a acetaldehído. El acetato que resulta de este proceso es metabolizado en el hígado a Acetil-CoA que, posteriormente, formará parte del ciclo de Krebs y de la síntesis de lípidos.

El alcohol que no se ha eliminado mediante su metabolización, que es una fracción minoritaria, se eliminará sin transformaciones incorporándose a la orina, las heces, el sudor o el aire exhalado (Lieber *et al.*, 1975; Aragón *et al.*, 2002). La velocidad de eliminación puede variar entre 10 y 20 mg por 100 ml de sangre y hora, y no se ve afectada por factores como la edad o el sexo, pero sí por la frecuencia en el consumo (Aragón *et al.*, 2002).

### 1.3.2. Toxicocinética de la cocaína

La cocaína tiene diversas presentaciones (clorhidrato, pasta base y pasta de coca, entre otros) y modos de ser consumida (Tabla II). De las formas de consumo posibles, las dos más habituales son la vía intranasal y la fumada, por las que es rápidamente absorbida a través de membranas nasales y pulmonares, pasando a la circulación sanguínea y provocando unos intensos efectos, pero de corta duración.

El clorhidrato de cocaína es muy soluble en agua, por lo que es la presentación que normalmente se emplea para la por vía parenteral. Además, se absorbe rápidamente por vía nasal, inhalada. Tras 2 a 5 minutos de haber inhalado 20–30 mg de cocaína se produce una euforia que puede durar hasta 45 minutos (Jatlow, 1987). La absorción intranasal varía con el tiempo debido a la vasoconstricción local, que da lugar a variaciones en la biodisponibilidad entre el 20 y el 60 % y a cambios permanentes en la mucosa cuando el consumo es continuado (Jatlow, *et al.*, 1987).

Por su parte, en lo que se refiere a las dos presentaciones alcaloides, pasta base y pasta de coca, debido a la gran área de absorción de los pulmones, una vez inhaladas precisan de 6 a 8 segundos para el tránsito desde la mucosa del pulmón al SNC y permiten una alta biodisponibilidad (un 60%) en comparación con la vía intravenosa (Foltin y Fischman, 1992).

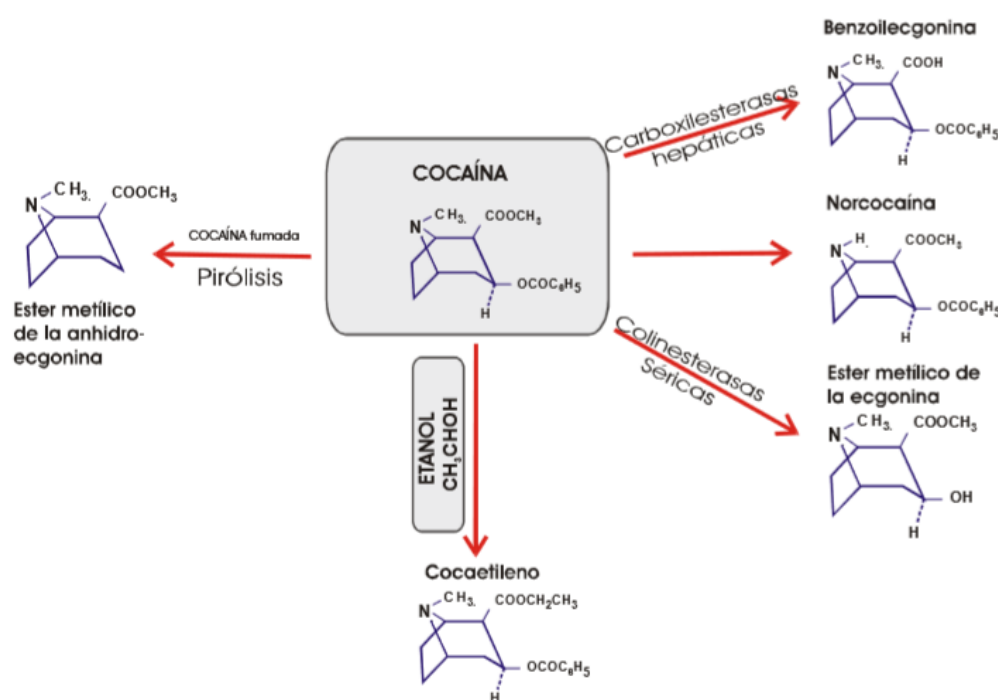
Sea administrada de uno u otro modo y tipo de presentación, una vez en el organismo la cocaína se metaboliza casi en su totalidad, eliminándose solamente del 1 al 5 % por la orina sin alteraciones (Cascales *et al.*, 2004). La cocaína no metabolizada tiene afinidad por los tejidos grasos y alcanza rápidamente el cerebro (Fish y Wilson, 1969). Por otro lado, el volumen de distribución de la cocaína oscila entre 1,5 y 2 L/kg, con un aclaramiento de 2.10 L / min y un  $t_{1/2}$  aproximado de 48 minutos (Chow *et al.*, 1985).

**Tabla II.** Formas de consumo de la cocaína (Modificado de Lizasoain *et al.*, 2002)

Tipo	Concentración de cocaína	Vía de administración	% en plasma	Aparición de efectos	Conc máxima en plasma	Duración efectos	Dependencia
<b>HOJA DE COCA</b>	0,5-1,5%	Mascado / infusión oral	20-30%	Lenta	60 minutos	30-60 min	No
<b>CLORHIDRATO DE COCAÍNA</b>	12-75%	Tópica: esnifada	20-30%	Relativamente rápida	5-10 minutos	30-16 min	A largo plazo
<b>CLORHIDRATO DE COCAÍNA</b>	12-75%	Genital, ocular	100%	Rápida	30-45 segundos	10-20 min	A corto plazo
<b>PASTA DE COCA</b>	30-80% (sulfato cocaína)	Parenteral: endovenosa subcutánea intramuscular	70-80%	Muy rápida	8-10 segundos	5-10 min	A corto plazo
<b>COCAÍNA BASE o CRACK</b>	30-80% (alcaloide cocaína)	Fumada	70-80%	Muy rápida	8-10 segundos	5-10 min	A corto plazo

Los tres principales metabolitos directos de la cocaína son la ecgonina metil éster (45%), la benzoilecgonina (45%) y la norcocaína (<10%) (Figura 4). Un alto porcentaje de la cocaína que llega al organismo se metaboliza por una vía hidrolítica, a través de las pseudocolinesterasas, a ecgonina metil éster, y por medio de

carboxilesterasas hepáticas, a benzoilecgonina (Quinn *et al.*, 1997). En un segundo paso, pequeñas cantidades de benzoilecgonina y de ecgonina metil éster se transforman en ecgonina, posiblemente por una hidrólisis no enzimática (Cascales, *et al.*, 2004). Estos tres metabolitos no tienen hepatotoxicidad y se excretan por la orina (Kloss, *et al.*, 1984). La otra ruta metabólica (10%) es oxidativa y se produce en el hígado (microsomos hepáticos) a través de isoformas de CYP450, particularmente CYP2E1 y CYP2A, produciéndose norcocaína



**Figura 4.** Metabolitos principales de la cocaína. Modificado de Pomillo y Vitale, 2005.

Existe una producción secuencial de los compuestos norcocaína, N-hidroxinorcocaína y nitróxido de norcocaína, los cuales son responsables de la inducción de procesos de hepatotoxicidad (Bouis y Boelsterli, 1990; Boelsterli y Göldlin, 1991; Bornheim, 1998) por dos mecanismos distintos. El primero, por la unión covalente de metabolitos oxidativos (nitróxido de norcocaína u otro posible metabolito) a proteínas y/o lípidos (Bouis y Boelsterli, 1990). El segundo, mediante un ciclo redox, entre la N-hidroxinorcocaína y el nitróxido de norcocaína, por la enzima CP450, con consumo de NADPH y que resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno o el anión peróxido (Göldlin y Boelsterli, 1991). Por otro lado, la hepatotoxicidad de la N-hidroxinorcocaína, testada en animales, es superior a la de cocaína y norcocaína (Shuster, *et al.*, 1983). No obstante, tanto el

nitróxido de norcocaína como otros radicales libres están en pequeñas cantidades y generalmente no alcanzan niveles farmacológicamente efectivos que originen problemas clínicos (Lizasoain *et al.*, 2002). Finalmente, esta rápida metabolización de la cocaína hace que deje de detectarse en la orina entre cuatro y seis horas desde su consumo, lo que exige que se recurra a algunos de sus metabolitos en las pruebas forenses.

Respecto a las diferencias entre sexos en el metabolismo de la cocaína, se tiene constancia de que en las ratas hembra los niveles plasmáticos de norcocaína y ecgonina metil éster son mayores que en los machos, mientras que éstos muestran niveles más elevados de benzoil ecgonina (Festa *et al.*, 2004).

### 1.3.3. Interacciones toxicocinéticas alcohol-cocaína

Uno de los efectos de la presencia conjunta de ambas drogas en el organismo es que la vida media de la cocaína en plasma es más larga. Así, se ha descrito en estudios con humanos voluntarios sanos que la administración de 1,2 mg/kg p.v. de cocaína más 1g/kg p.v. de alcohol resultó en una mayor duración de la cocaína en plasma, comparada con la que se obtuvo en el grupo de personas que recibieron cocaína más placebo (Harris *et al.*, 2003). Igualmente, Farré *et al.* (1993) estudiando el efecto de la administración aguda de cocaína (100 mg, intranasalmente) y alcohol (1 g/kg, oralmente) a personas sanas no dependientes, encontraron que la presencia de alcohol aumentaba los niveles plasmáticos de cocaína, con reflejo en la  $C_{max}$  y en AUC. La vía de administración de la cocaína parece ser importante ya que, en humanos, se alcanzan mayores concentraciones plasmáticas de esta droga en presencia de alcohol por vía intravenosa que por la oral o la fumada (Herbst *et al.* 2011).

En el caso de la benzoilecgonina, se ha comprobado que la concentración máxima es inferior en las personas que toman simultáneamente cocaína más alcohol. Por otro lado, en la Tabla III pueden verse los valores de diferentes parámetros farmacocinéticos de la cocaína y sus metabolitos tras la administración de esta droga a humanos, bien sola o en presencia de alcohol (Farré *et al.*, 1993).

Los procesos oxidativos son la principal vía metabólica para el alcohol y, aunque son secundarios en la cocaína, la concurrencia de estas dos sustancias genera interacciones que resultan en un aumento de sus efectos tóxicos (Dean *et al.*, 1992). Se sabe que el alcohol modifica la biotransformación de la cocaína, tanto en ratas (Pan y Hedaya, 1999), como en humanos (Harris, *et al.*, 2003) y que el consumo previo de alcohol aumenta los niveles plasmáticos de cocaína (Pérez-Reyes y Jeffcoat, 1992;

Farré et al., 1993). En términos generales, lo que ocurre es una inhibición de la vía hidrolítica (más inocua) y una potenciación de los procesos oxidativos. Por un lado, se inhibe la hidrólisis del grupo éster metílico de la cocaína, realizada por las carboxilesterasas, lo que genera una menor producción de benzoilecgonina; y por el otro, estas carboxilesterasas catalizan el paso de la cocaína al cocaetileno (Rafla y Epstein, 1979; Dean, *et al.*, 1991). También aparecen otros metabolitos relacionados, como el norcocaetileno y la benzoilnorecgonina, que igualmente tienen su origen en las carboxilesterasas microsomales hepáticas y que contribuyen a la toxicidad general del cóctel de cocaína y alcohol (Dean, *et al.*, 1992).

Farmacocinética de cocaína y sus metabolitos						
	Cocaína		Benzoilecgonina		Ecgonina metil-éster	
	C	C/A	C	C/A	C	C/A
<b>C<sub>max</sub></b> (ng/ml)	225,9±80,7	343,8±93,5	778,0±388,4	537,4±153,9	129,8±80,8	86,2±44,5
<b>T<sub>max</sub></b> (min)	58,2±18,1	37,9±16,9	213,3±112,6	186,7±59,6	128,3±36	131,6±65,3
<b>AUC (0-480)</b> (ng.min/ml)	38353,8± 16190,1	54037,0± 19152,8	239685,1± 97405,0	165292,9± 52922,1	30583,1± 19855,1	22793,5± 14446,4
	Norcocaína		Cocaetileno			
	C	C/A	C	C/A		
<b>C<sub>max</sub></b> (ngr./ml)	1,5±1,4	3,5±1,7		53,3±12,2		
<b>T<sub>max</sub></b> (min)	130,0±74,5	107,0±54,5		121,7±37,7		
<b>AUC (0-480)</b> (ng.min/ml)	263,6± 255,0	592,7± 199,2		13331,8± 4519,5		

**Tabla. III.** Farmacocinética de la cocaína y sus metabolitos en humanos (Farré *et al.*, 1993). **AUC** calculado de 0 a 330min. **C** = cocaína (100mg), **C/A** = cocaína/alcohol. (100mg/kg p.v. +alcohol 1 gr/Kg p.v.).

La relativa alta AUC del CE en hígado, pulmón y riñón indica que estos pueden ser los tejidos principales donde se forme este metabolito (Dean *et al.*, 1995). Su metabolización podría ser realizada por carboxilesterasas, la cual podría verse también afectada por la presencia de alcohol (Laizure, *et al.*, 2003). Así, en estudios en perros, estos últimos autores citados observaron variables farmacocinéticas de disposición de CE y cocaína con valores de aclaramiento de  $0.91 \pm 0.22$ , para cocaína, y  $0.79 \pm 0.16$  l/min, para el CE, así como volúmenes de distribución de  $2.6 \pm 0.82$  y  $2.7 \pm 0.47$  l/kg, respectivamente. Sin embargo, en presencia de alcohol el aclaramiento de cocaína y de CE se redujo en un 20% en ambas sustancias (Laizure *et al.*, 2003).

#### 1.4. Modelos animales de consumo y adicción a drogas

En una revisión reciente Spanagel (2017) sostiene la validez de los modelos animales para el estudio de las adicciones, tanto los de administración voluntaria (operante y no operante), como los basados en las manifestaciones clínicas y síntomas descritos en manuales de diagnóstico psicológico y psiquiátrico. Este planteamiento se apoya en que los sustratos neuroquímicos y neuroanatómicos implicados en el consumo y adicción a drogas son similares en humanos y en animales de laboratorio. Como es bien sabido, los modelos animales de consumo y adicción a drogas deben tener validez predictiva y capacidad translacional, para exportar a la realidad clínica hallazgos obtenidos en el laboratorio, incluso, con un salto entre especies. A este respecto, algunos resultados positivos obtenidos mediante modelos animales en fármacos para tratar el alcoholismo demuestran que es posible obtener validez predictiva mediante su empleo (Spanagel, 2017).

La gran variedad de modelos ya desarrollados permite reproducir experimentalmente muchos de los componentes de la conducta adictiva, como es el poder reforzante de una droga; aspectos cognitivos, como el procesamiento de asociaciones droga-contexto; o los procesos de sensibilización o de tolerancia a los efectos de una sustancia (García *et al.*, 2017). Además, hacen posible una mejor comprensión de las distintas etapas del proceso adictivo como son la adquisición de la conducta adictiva o la recaída en el consumo de drogas.

Aunque existen diferentes paradigmas experimentales y se emplean distintas especies y vías de administración, se puede hacer una diferenciación general entre los modelos donde el animal recibe la droga de forma pasiva y los que, por el contrario, el animal voluntariamente se autoadministra la sustancia. Dentro de estos últimos, hay que diferenciar entre la autoadministración operante, que requiere de una acción del animal para conseguir la droga, y la que no requiere de esta acción, denominada no operante. A continuación, se describen algunas metodologías que destacan por su especial interés en el estudio de los problemas asociados al consumo de cocaína y/o alcohol

### **1.4.1. Modelos de administración pasiva de drogas**

#### **1.4.1.1. Condicionamiento de preferencia al lugar**

El paradigma de condicionamiento de preferencia al lugar (CPL) se apoya en las propiedades motivacionales de una droga como estímulo no condicionado y que se combina con estímulos ambientales, que originalmente son neutros, pero que adquieren propiedades motivacionales (Tzschentke, 2007). Es, por tanto, un aprendizaje asociativo. Se valora la preferencia que el animal tiene por un contexto (formas, texturas, olores) que se ha asociado previamente con la recepción de una droga, aun teniendo otra opción disponible, un contexto alternativo neutro. La variable que se mide es la diferencia en el tiempo de permanencia del animal entre ambos contextos, cuando el animal tiene la posibilidad de elegir libremente. Algunas de las ventajas del CPL son: sensibilidad tanto para la recompensa como para la aversión; validez para especies diferentes, y que permite valorar simultáneamente la actividad motora; producción de curvas dosis-efecto monofásicas; y utilidad para indagar los circuitos neuronales involucrados en la recompensa de drogas (Bardo y Benvins, 2000). Este modelo del CPL ha sido ampliamente empleado en estudio de drogas estimulantes como la cocaína.

### **1.4.2. Modelos de autoadministración de drogas**

Los modelos de autoadministración se apoyan sobre la base de que las sustancias que tienen capacidad adictiva para humanos, son generalmente autoadministradas por los animales de laboratorio. Como ya hemos indicado, dentro de los procedimientos de autoadministración podemos establecer dos categorías dependiendo de si el animal debe de realizar una acción para conseguir la droga (conducta operante) o bien si la droga está disponible sin realizar ninguna acción, (conducta no operante).

#### **1.4.2.1. Modelos operantes de autoadministración**

La forma de administrar la droga, el reforzador, en los procedimientos operantes se adapta a múltiples vías de administración: intravenosa, oral, intraventricular, intracraneal o intragástrica (Sanchis-Segura y Spanagel, 2006). La acción a realizar para conseguir la droga puede ser el presionar una palanca, introducir la nariz en un agujero ("*nose-poke*" en inglés) o hacer girar una rueda, entre otras. En



los programas denominados de razón fija, el número de respuestas necesario para conseguir la droga permanece estable. Pero para valorar la capacidad reforzadora de una droga, bajo un programa de autoadministración operante, se emplean programas de razón progresiva, en los que se va aumentando progresivamente el número de respuestas necesarias para conseguir una dosis de la misma hasta llegar al denominado *punto de ruptura*. Alcanzándose el denominado punto de ruptura, cuando el animal ya no se ve motivado para continuar esforzándose en obtener la droga, dado el alto número de respuestas exigidas. Los programas de razón progresiva se han utilizado para valorar la capacidad adictiva de las drogas y los fármacos (Stafford, et al., 1998).

#### **1.4.2.2. Autoadministración intravenosa**

La utilidad de las pruebas de autoadministración de drogas en animales para predecir la potencialidad de abuso en humanos está ampliamente aceptada desde hace décadas (Collins, *et al.*, 1984; Griffiths y Balster, 1979). La autoadministración por vía intravenosa de drogas tiene, generalmente, mayor capacidad de motivación que la oral (Meisch, 2001). Debido a esto, los estudios sobre sustancias con capacidad de generar problemas de abuso, que se consumen de forma oral como las benzodiacepinas, han mostrado más validez y fiabilidad en modelos de autoadministración intravenosa (Ator y Griffiths, 1987). La voluntariedad en la administración de la sustancia proporciona validez ecológica a los modelos de autoadministración y, a pesar de su mayor complejidad técnica, la autoadministración de drogas por vía intravenosa, es un procedimiento ampliamente utilizado, que permite valorar la motivación que el animal tiene por conseguir una sustancia posibilitando un gran control de las variables experimentales, tanto farmacológicas como conductuales.

#### **1.4.3. Modelos no operantes de autoadministración**

Los modelos de autoadministración de drogas no operantes están limitados a la forma oral de administración y, generalmente, se han utilizado con el alcohol, aunque en estudios con otras drogas como cannabinoides también han sido empleados. Pese a que las drogas pierden cierta efectividad como reforzadores cuando se emplea la vía oral y ello puede estar relacionado con algunos de los problemas de esta ruta de administración, como son: sabor aversivo; retraso en el inicio de los efectos en el SNC; y bajas cantidades consumidas (Meisch, 2001).

#### 1.4.4. Modelos animales para el estudio del consumo de alcohol

Como modelo animal de alcoholismo muy frecuentemente se recurre al consumo oral, aunque con diferentes estrategias (Bell *et al.*, 2017). Mediante la autoadministración oral, se alcanzan cantidades acumuladas de 4,6 g / kg / 24 h para ratas Wistar y 7,6 g / kg / 24 h para las líneas “*Alcohol-Preferring Rats*” (ratas-P) (Fredriksson *et al.*, 2017).

Las ratas-P son líneas genéticas seleccionadas desde hace décadas por su alto o bajo consumo de alcohol. Algunas de estas líneas son:

- Universidad de Chile, líneas Ucha/Uchb (Mardones *et al.*, 1983).
- Sardinian lines SP/SNP (Fadda *et al.*, 1989).
- Universidad de Indiana, líneas P/NP y líneas HAD/LAD (Li *et al.* 1981).
- Alko (Finlandia), líneas AA/ANA (Eriksson, 1969).

Estas líneas se emplean tanto en la administración oral como la intravenosa. Ya sea de forma voluntaria o pasiva, la administración intravenosa se ha empleado en roedores (Hyytia *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1976; Crupp, 1981), aunque no de forma generalizada. Como ya hemos indicado, la vía intravenosa tiene ventajas respecto a la vía de administración oral, como un mayor control de las variables farmacocinéticas o la capacidad de evitar variables extrañas, como son las diferencias entre individuos en la absorción o en la sensibilidad orofaríngea y, además, permite un mejor seguimiento de las variables conductuales (Meisch, 2001). A pesar de estas ventajas el empleo de la vía intravenosa en ratas no está del todo extendido y la autoadministración oral sigue siendo la opción preferida (Bell *et al.*, 2007).

##### 1.4.4.1. Sistema de dos botellas

Como estrategias para sortear los efectos aversivos del alcohol en la rata, algunas veces se requiere de la adición de sacarosa al agua de bebida, de la privación de agua de bebida o del empleo del denominado sistema de dos botellas (Tabakoff y Hoffman, 2000). El sistema de dos botellas, más conocido por su término en inglés “two-bottle choice” mide la preferencia del animal por el alcohol de una botella con este contenido, pero con la opción de elegir otro alternativo mediante otra botella que, generalmente, contiene agua (García *et al.*, 2017). La concentración de alcohol, generalmente, va aumentando a lo largo del tiempo. Aunque es un modelo ampliamente extendido como forma de consumo voluntario, tiene algunas

limitaciones como es la dificultad de evaluar la motivación del animal por conseguir el alcohol (Tabakoff y Hoffman, 2000).

#### **1.4.5. Modelos de policonsumo de cocaína y alcohol**

Tanto los ensayos clínicos, como la investigación básica con animales, se centran generalmente en el estudio de una sola sustancia. Algunos ensayos clínicos, incluso, rechazan a pacientes policonsumidores, aunque el consumo de varias sustancias o de clases de sustancias es el patrón más habitual. No obstante, hay investigadores en el área que recomiendan que se tenga en cuenta este aspecto, tanto en humanos (Rounsaville *et al.*, 2003), como en estudios preclínicos con animales (Bell *et al.*, 2017; Liu *et al.* 2018). Parece claro, por tanto, la necesidad de trasladar la realidad epidemiológica del policonsumo de sustancias psicoactivas a modelos animales que lo simulen y, en particular, para la combinación de alcohol y cocaína.

Aunque existe un buen número de estudios en animales de exposición crónica a cocaína y alcohol de forma simultánea, pocos han empleado la autoadministración intravenosa. A este respecto, Ikegami *et al.* (2002) emplearon la autoadministración simultánea de cocaína y alcohol como estrategia para generar una preexposición al alcohol. En este trabajo observaron que la dosis de cocaína tuvo un efecto sobre la cantidad total de cocaína autoadministrada en cada sesión, pero no en la dosis acumulada de alcohol. Por su parte, Winger y colaboradores (1997; 2007) estudiaron en monos si el alcohol influía en la autoadministración de otras sustancias con potencialidad adictiva, incluida la cocaína. La motivación de los monos, por ejemplo, para recibir de forma combinada cocaína y alcohol, mantenía tasas con valores intermedios entre la cocaína sola y el alcohol solo. En otros experimentos comprobaron que el pretratamiento con alcohol en rango de dosis de 0.1 a 1.78 g/kg p.v. no afectaba a la autoadministración de cocaína cuando el alcohol se administraba a través de una sola infusión Intravenosa pasiva, 10 minutos antes de que la cocaína estuviera disponible (Aspen y Winger, 1997; Winger *et al.*, 2007).

Algunos modelos animales, donde la cocaína se administraba de forma intravenosa y el alcohol de forma oral, han tratado de aportar explicaciones a la alta prevalencia en humanos a este poliabuso. Por ejemplo, se ha estudiado en ratas si el alcohol reduce la ansiedad asociada al consumo de cocaína. A este respecto, Knackstedt y Ettenberg (2005) comprobaron que el alcohol reducía el conflicto de evitar una inyección de cocaína. Así las ratas a las que se permitía beber una solución

de sacarosa-alcohol, inmediatamente después de la entrada en un corredor en el que se les administraba una dosis de cocaína por vía intravenosa, evitaban menos esa autoadministración de cocaína que aquellas ratas que no tenían esta opción. En un trabajo posterior, estos autores comprobaron que el cocaetileno podría no ser un factor decisivo para explicar este policonsumo. Es conocido que, los niveles de CE son significativamente menores cuando es la dosis de cocaína la que precede a la de alcohol. Basándose en lo anterior, estos mismos autores, cambiaron el orden de administración en su modelo de administración intravenosa de cocaína y oral de alcohol y observaron que las ratas tratadas previamente con cocaína ingerían significativamente más alcohol que los controles salinos, incluso cuando no se alcanzaba un nivel en plasma de CE apreciable (Knackstedt *et al.*, 2006). Por tanto, se podría atribuir a la necesidad de reducir los efectos ansiogénicos de la cocaína como principal motivación para encadenar una dosis de alcohol tras una de cocaína y no a la participación del CE.

## 1.5. Sistemas de neurotransmisión

Es bien conocido que son numerosos los sistemas de neurotransmisores que participan en la regulación de los efectos de las drogas de abuso. Entre ellos, destacan el sistema dopaminérgico, el opioideérgico, el GABAérgico, el glutamatérgico, el serotoninérgico, el colinérgico, el adrenérgico y el endocannabinoide, por citar los más importantes. De entre ellos, está bien contrastado en la literatura científica que el sistema de neurotransmisión dopaminérgico es uno de los más esenciales en los efectos adictivos de todas las drogas de abuso. Por ello, es obligado tratarlo, aunque sea sucintamente, en este apartado. Igual se debería hacer con todos los citados anteriormente, pero por limitaciones de espacio, consideramos que debemos centrarnos más en los que se han estudiado en la presente Tesis Doctoral. Es por ello que, junto al dopaminérgico, expondremos con algo más de detalle lo referido a los sistemas GABAérgico, glutamatérgico y endocannabinoide.

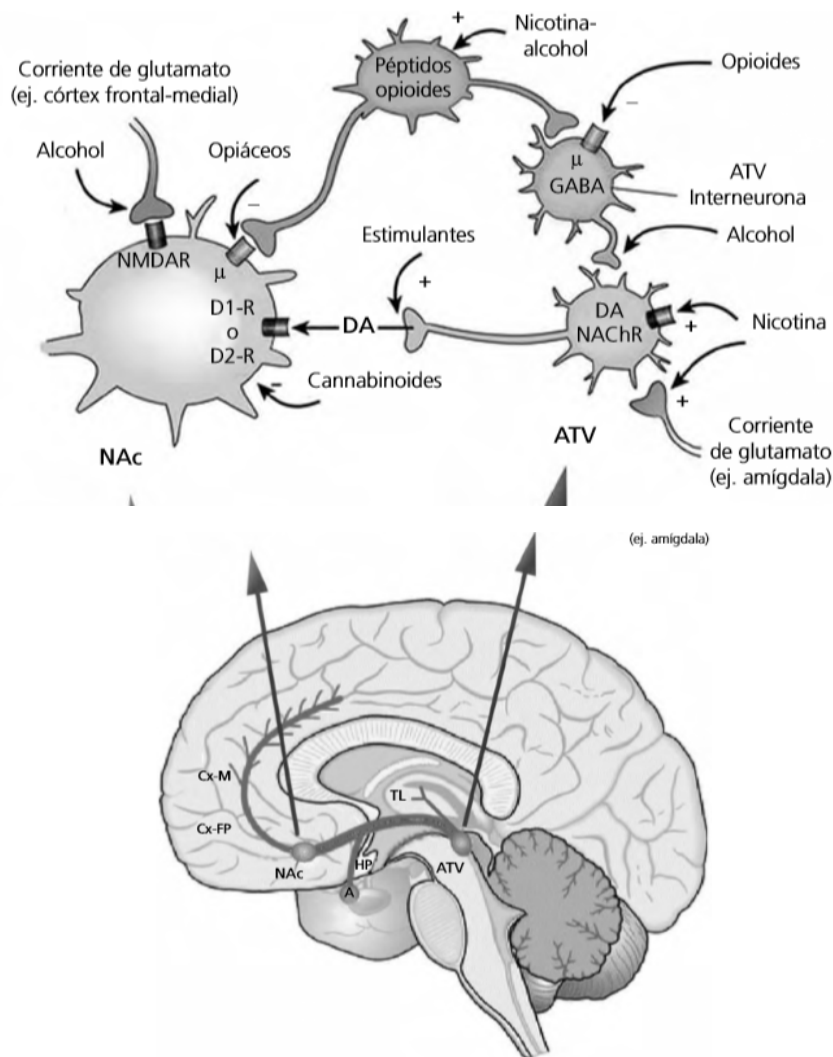
### 1.5.1. Sistema dopaminérgico

En el SNC la dopamina (DA) es un neurotransmisor catecolaminérgico que participa en la regulación de la afectividad, la emoción o la regulación motora. Los cinco tipos de receptores de dopamina conocidos (D1 a D5) están acoplados a proteínas G. Los subtipos D1 (D1 y D5) y D2 (D2, D3 y D4) tienen características comunes, de modo que ambos modulan la formación de AMPc como mecanismo de transducción de señales. Pero, mientras que el subtipo D2 inhibe la formación de AMPc, el subtipo D1 la estimula.

La dopamina se sintetiza en los terminales nerviosos a partir de L-tirosina, un aminoácido (AA) con un papel importante como precursor de la ruta metabólica de las catecolaminas. La Tirosina hidroxilasa (TH) participa en la conversión de L-tirosina en L-dopa (dihidroxifenilalanina), precursora de la dopamina. TH es la enzima limitante en la ruta metabólica catecolaminérgica. La L-dopa-dexcarboxilasa es la enzima responsable del paso siguiente, desde L-dopa hasta la DA (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

Drogas con efectos psicoactivos tan diferentes como los estimulantes, los opiáceos, el alcohol o los barbitúricos tienen la característica común de incrementar la actividad del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico de recompensa (De Wit y Wise, 1977; Wise, 1984; Di Chiara e Imperato, 1986). La neurotransmisión dopaminérgica en la vía mesocorticolímbica resulta fundamental en el proceso adictivo

por su papel en los efectos reforzadores de las drogas de abuso. Estas sustancias afectan a estructuras y sistemas de neurotransmisión sobre los que actúan los reforzadores naturales como el sexo, los alimentos o las interacciones sociales, pero generando efectos neuroquímicos muy superiores a éstos, en cuanto a la liberación de DA, por ejemplo.



**Figura 5.** Acciones de diferentes drogas sobre la regulación dopaminérgica en ATV y NAc del circuito mesocorticolímbico. Guerri (2012); Modificado de Hyman *et al.* (2006).

El VTA contiene neuronas que se proyectan ampliamente en el cerebro anterior y liberan dopamina (DA). Estas neuronas median sobre las propiedades gratificantes de todas las drogas de abuso (Di Chiara e Imperato, 1988; Wise). La dopamina es liberada en el NAc por neuronas cuyos cuerpos celulares están en ATV. Desde el ATV las proyecciones, además de hacia el NAc, lo hacen hacia la CPF, hipocampo, amígdala y

tubérculo olfatorio, entre otras áreas (Koob y Le Moal, 2001; Rodríguez-Jiménez, 2006). Los distintos tipos de drogas actúan de forma diferente sobre este circuito, pero con la característica común de generar una liberación de DA en el NAc. De esta manera, los estimulantes como la cocaína y las anfetaminas inhiben la recaptación de DA en el terminal presináptico y aumentan así los niveles de DA en el espacio sináptico. Los opiáceos inhiben a interneuronas GABAérgicas en el ATV causando, finalmente, la liberación de DA en el NAc. La nicotina actúa sobre receptores colinérgicos de tipo nicotínico en el ATV e induce por esta vía una liberación de DA en el NAc. El alcohol incrementa la DA en el NAc mediante diferentes mecanismos y, entre otros, actuando sobre los opioides endógenos (Guerri, 2012) (Figura 5). Además de la DA, otros neurotransmisores como el glutamato, GABA, serotonina y los sistemas opioide y cannabinoide desempeñan una función en el proceso adictivo por medio de la modulación del sistema dopaminérgico a través de diferentes mecanismos.

Como ya hemos indicado, la cocaína bloquea los sistemas de recaptación de dopamina hacia el terminal presináptico provocando un aumento transitorio de la concentración de este neurotransmisor en el espacio sináptico (Heikkila, *et al.*, 1975). Esta acción de la cocaína es esencial en la generación de las propiedades como reforzador de esta sustancia (De Wit y Wise, 1977; Wise, 1984). Durante el consumo crónico se produce una situación bifásica en la liberación de dopamina. Por una parte, en el momento de la ingesta existe una elevación de los niveles de dopamina extracelular y, por otra, al cesar el consumo, se manifiesta una disminución de la liberación endógena de dopamina.

Si se repite el consumo se puede producir un agotamiento en el cerebro de la dopamina disponible, que es compensado con un aumento de los niveles de receptores dopaminérgicos (Wyatt *et al.*, 1998). Esta carencia de DA puede tener una relación causa efecto con el deseo de volver a consumir (Dackis y Gold, 1985). No obstante, es preciso decir que también otros trabajos han demostrado que con el consumo crónico continuado se generan mecanismos de compensación que conllevan un descenso de los receptores disponibles de DA en el núcleo estriado que es atribuido a un proceso de tolerancia (Volkow *et al.*, 1990). Como efecto de lo anterior, la función dopaminérgica puede aparecer inhibida durante la abstinencia a distintas drogas de abuso, como cocaína, morfina, alcohol o nicotina (Weiss *et al.*, 1992; Corominas *et al.*, 2007). En el caso de la cocaína, esta reducción de la liberación basal de DA en el NAc podría contribuir a la anhedonia observada durante la abstinencia de esta droga (Weiss *et al.*, 1992)

El alcohol, administrado de forma aguda, actúa sobre la ATV, incrementando la frecuencia de descarga de neuronas dopaminérgicas mediante su actuación en interneuronas GABAérgicas (Guerri, 2000), lo cual se traduce en un aumento de los niveles de DA en NAc y la CPF (Weiss *et al.*, 1993). Así, se ha comprobado que la administración oral de alcohol en ratas induce una liberación de DA dosis-dependiente, en el NAc (Dichiara, 1997; Weiss *et al.*, 1993). También en las ratas P, estirpes seleccionadas por su avidez por el alcohol, se ha apreciado que muestran una liberación de DA en el NAc muy superior a ratas Wistar, sin esta preferencia por el alcohol, tras la autoadministración oral de alcohol. Esta liberación de DA extracelular, que se cuantificó mediante microdiálisis intracraneal, no se reprodujo cuando la sustancia era sacarina (Weiss *et al.*, 1993). Por otra parte, Cunningham *et al.*, (2000) observaron que el bloqueo de receptores de DA reduce la ingesta de alcohol.

### 1.5.2. Sistema GABAérgico

La neurotransmisión GABAérgica tiene un importante rol en la génesis de los efectos psicoactivos del alcohol. Dosis de alcohol relativamente bajas son suficientes para potenciar la neurotransmisión GABAérgica (Lobo y Harris, 2008). Como sabemos, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor que activa los receptores de GABA, provocando un flujo de iones cloro y generando hiperpolarización celular. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC (Barnard *et al.*, 1998) y su activación tiene efectos de sedación, anestesia e hipnosis entre otros. Hay tres tipos de receptores GABA: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, y GABA<sub>C</sub>. Los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> son del tipo activado por ligando, mientras que los GABA<sub>B</sub> están acoplados a proteínas G.

Los receptores GABA<sub>A</sub> están ampliamente presentes en el cerebro y médula espinal y median en la mayoría de los efectos depresores del SNC (Johnston, 1996). El alcohol actúa sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, facilitando la entrada de iones de cloro y generando una hiperpolarización de la membrana y, en consecuencia, un aumento de la acción inhibitoria, que produce sedación y ausencia de coordinación motora, entre otros efectos (Lijequist y Engel, 1982). Mediante el empleo de agonistas y antagonistas GABAérgicos se pueden alterar algunas acciones del alcohol como es la sedación. Por ejemplo, el agonista muscimol potencia las propiedades sedativas del etanol, mientras que el antagonista picrotoxina las reduce y aumenta la actividad locomotora (Lijequist y Engel, 1982).

Los receptores GABA<sub>A</sub>, además de para el alcohol, son la diana de otras sustancias psicoactivas como benzodiacepinas, barbitúricos y anestésicos, lo que



origina interacciones, como la tolerancia cruzada entre el alcohol y esos fármacos o la capacidad de estos últimos de reducir la sintomatología de abstinencia al alcohol. La exposición crónica al alcohol reduce el acoplamiento entre los lugares de acoplamiento de agonistas de benzodiacepinas y los canales del cloro y ello podría participar en el desarrollo de tolerancia cruzada entre alcohol y agonistas de benzodiacepinas (Buck y Harris, 1990). También, mediante mecanismos de compensación ante una exposición prolongada al alcohol, se producen cambios en el ARNm y en los niveles de proteína de los receptores GABA<sub>A</sub> (Buck, 1996).

Por otra parte, en el cromosoma 5q de humanos se han descrito los siguientes tipos de genes del receptor GABA<sub>A</sub>: *Gabra1*, *Gabrb2*, *Gabra6* y *Gabrg2* que, en estudios con animales, se ha comprobado su implicación en diversas conductas relacionadas con el uso del alcohol (Dick *et al.*, 2006). Los genes de la subunidad GABA<sub>A</sub> se encuentran ampliamente expresados en los circuitos de recompensa y diversos estudios preclínicos sugieren que cambios en la expresión de subunidades de receptor GABA<sub>A</sub> se relacionan con el desarrollo de tolerancia y dependencia al alcohol. A este respecto, investigaciones multicentro como el *Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism* (COGA) han permitido encontrar una asociación entre *Gabra1* y dependencia, nivel de tolerancia y edad de la primera borrachera entre otros parámetros del alcoholismo (Dick *et al.*, 2006). Se conoce también la relación entre los haplotipos de *Gabra2* y la susceptibilidad o riesgo de dependencia del alcohol (Soyka *et al.*, 2008). Así, en humanos particularmente el *Gabra2*, parece estar implicado en el alcoholismo (Enoch, 2008) y se ha observado que en el hipocampo se produce una depleción en la expresión del gen de la subunidad  $\gamma 2$  (*Gabrg2*), tanto por efecto de la cocaína como del alcohol (Enoch *et al.*, 2012).

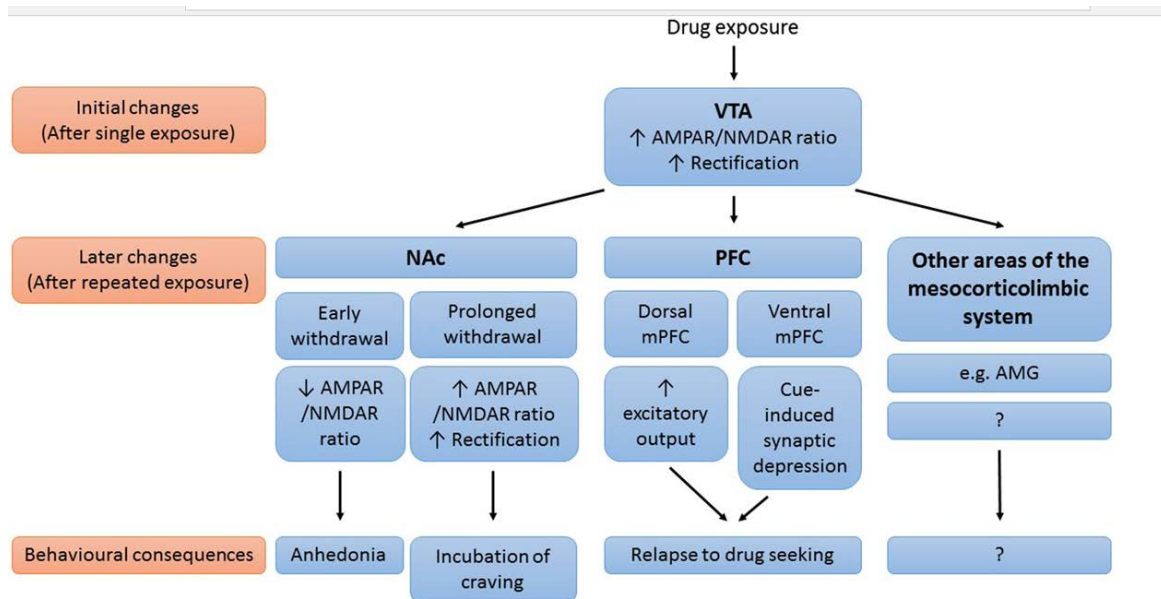
Mediante el registro de los potenciales de membrana, en rodajas de cerebro de cobaya se ha encontrado que la cocaína inhibe la liberación de GABA en el ATV a través de la inhibición de la recaptación de serotonina y de la actuación de esta sobre receptores presinápticos 5-HT. Ello sugiere que hay una modulación indirecta de las neuronas de dopamina del ATV por medio de 5-HT y GABA, que realizarían una desinhibición neuronal con efectos sobre la acción aguda de la cocaína (Cameron y Williams, 1994). Por otro lado, una administración repetida de cocaína aumenta el GABA extracelular en el NAc, el cual actúa sobre autorreceptores GABA<sub>B</sub> que regulan los niveles de GABA, glutamato y dopamina (Xi, *et al.*, 2003).

### 1.5.3. Sistema glutamatérgico

Los receptores de glutamato constituyen el grueso de la neurotransmisión excitatoria en el SNC y participan en la plasticidad sináptica, así como en diversos trastornos neurológicos. Los receptores de glutamato se pueden clasificar en dos grupos: ionotrópicos, constituidos por canales iónicos acoplados a ligando, y metabotrópicos, que son receptores acoplados a proteínas G. Se conocen tres tipos de receptores ionotrópicos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los de Kainato (Ehlers, *et al*, 1996). A su vez, hay ocho subtipos de receptores metabotrópicos (mGluR1 a mGluR8) que modulan la transmisión sináptica excitadora. Los subtipos de receptores AMPA y kainato median, principalmente, en la neurotransmisión excitadora, mientras que los receptores del subtipo NMDA desempeñan, además, un papel importante en la plasticidad sináptica, el desarrollo neural y la muerte de las células neuronales excitotóxicas (Ehlers, *et al.*, 1996).

La transmisión glutamatérgica supone hasta el 70% de la transmisión sináptica en el SNC, con presencia de proyecciones y neuronas glutamataérgicas en múltiples circuitos cerebrales, como el mesocorticolímbico de recompensa. Todas las drogas de abuso modulan, aunque con mecanismos diferentes, la transmisión glutamatérgica. En general, la atenuación de la transmisión glutamatérgica reduce los efectos de la recompensa de las recaídas. Por otro lado, la potenciación de la transmisión glutamatérgica parece facilitar la extinción del comportamiento de búsqueda de drogas (Gass y Olive, 2008).

Tanto el VTA como el NAc reciben importantes aferencias glutamatérgicas. El bloqueo de la transmisión glutamatérgica mediante la administración de ligandos con afinidad por sus receptores es capaz de modular los aumentos de dopamina en el NAc inducidos por cocaína o nicotina (D'Souza, 2015), además de reducir sus efectos reforzadores. Aunque se le atribuye a la dopamina la función principal en las acciones agudas reforzadoras de las drogas, otras etapas del proceso adictivo que requieren de una exposición prolongada, como el ansia por consumir o las recaídas, cursan con una plasticidad alterada en la neurotransmisión glutamatérgica del sistema mesocorticolímbico (Bobadilla *et al.*, 2017; Engblom, 2008). Por lo tanto, parece claro que el glutamato es capaz de influir sobre el circuito mesocorticolímbico que media en el efecto reforzador de las drogas (van Huijstee y H.D. Mansvelder, 2015) (Figura 5).



**Figura 5.** Efecto sobre los distintos tipos de receptores glutamatérgicos de la exposición a drogas de abuso en NAc, CPF y otras regiones del sistema mesocorticolímbico. Modificado de van Huijstee y H.D. Mansvelder, 2015.

En modelos animales se ha encontrado que, tanto la exposición aguda, como la crónica al alcohol afectan a la expresión de los receptores NMDA (Xiang *et al.*, 2015). La exposición aguda disminuye los potenciales excitatorios postsinápticos e inhibe la potenciación a largo plazo dependiente de NMDA, mientras que la crónica facilita la expresión de las subunidades GluN1, GluN2 y GluN2 en hipocampo, amígdala y corteza de rata (Xiang *et al.*, 2015). Estos autores comprobaron además que, tras la exposición de siete días a alcohol, la expresión de los genes correspondientes a las subunidades de receptores de NMDA, R1, 2A, 2B y 2D (*Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b*, *Grin2D*), estaba incrementada y postularon que estas alteraciones en la expresión de dichos genes podrían contribuir al cuadro clínico del alcoholismo (Xiang *et al.*, 2015).

En la actualidad se dispone de evidencias que demuestran que la cocaína interacciona con los sistemas de neurotransmisión glutamatérgica presentes en el cerebro (Gass y Olive, 2008). En los primeros trabajos se observó que la sensibilización a los efectos de estimulación motora originados por la cocaína se veía bloqueada por un antagonista de los recptores NMDA (MK- 801) (Karler *et al.*, 1989). Adicionalmente a lo anterior, estudios de microdiálisis in vivo han demostrado que la cocaína incrementa los niveles extracelulares de glutamato en distintas estructuras de la vía de recompensa mesocorticolímbica como el NAc (Pierce *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1995) o el estriado dorsal (McKee y Meshul., 2005). Por otra parte, se ha descrito que una sola

inyección de cocaína induce en rata y ratón, 24 horas después, un incremento en la proporción/ratio de receptores AMPA/receptores NMDA en neuronas dopaminérgicas del ATV, tras el registro de corrientes excitatorias mediadas por AMPA (Ungless, *et al.*, 2001). Los aumentos inducidos por cocaína en la proporción entre receptores AMPA y receptores NMDA, como la descrita anteriormente, no se producen cuando la cocaína se administra junto con un antagonista de los receptores NMDA. Esto sugiere que la plasticidad en las sinapsis excitadoras de regiones dopaminérgicas como el ATV tiene un patrón similar tanto a largo como a corto plazo y en ambos casos es dependiente de la activación de receptores NMDA (van Huijstee y H.D. Mansvelder, 2015). Respecto a los receptores AMPA, en un modelo de incubación del “craving” nuestro grupo ha encontrado que la autoadministración de cocaína incrementó la expresión de los receptores AMPA Gria1 en el NAc shell (Roura-Martínez *et al.*, 2019).

#### 1.5.4. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide es un sistema de señalización lipídica constituido por dos tipos de receptores (CB1 y CB2), los ligandos endógenos (endocannabinoides) y un sistema enzimático para su síntesis y degradación. Los receptores CB1, aunque se encuentran repartidos por todo el cuerpo, están más presentes en el SNC (Freud *et al.*, 2003), mientras que los CB2 se localizan principalmente en las células inmunes, aunque a niveles bajos también se encuentran en el cerebro (Van Sickle *et al.*, 2005). Los receptores CB1 constituyen uno de los más abundantes neuromoduladores en el cerebro de los mamíferos, localizándose sobre todo en regiones como el neocórtex, hipocampo, cerebelo, cuerpo estriado o ATV (Herkenham *et al.*, 1990).

Los ligandos endógenos de estos receptores son conocidos como endocannabinoides y su estructura molecular es la de ácidos grasos poliinsaturados. Los dos más conocidos son la anandamida (AEA) o araquidoniletanolamida y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). Los dos son derivados del ácido araquidónico que, al conjugarse con etanolamina el primero y con glicerol el segundo, conforman estas dos moléculas (Devane *et al.*, 1992). Los endocannabinoides no se almacenan en vesículas y son sintetizados y liberados como respuesta ante un estímulo fisiológico (Fride, 2005). La biosíntesis de endocannabinoides se realiza a partir del fosfolípido presente en la membrana, la fosfatidiletanolamida, a N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) por medio de un proceso enzimático. La anandamida se origina por la acción de la fosfolipasa D a partir de NAPE y, por tanto, esta enzima es conocida como NAPE-PLD (Di Marzo *et al.*, 2004).

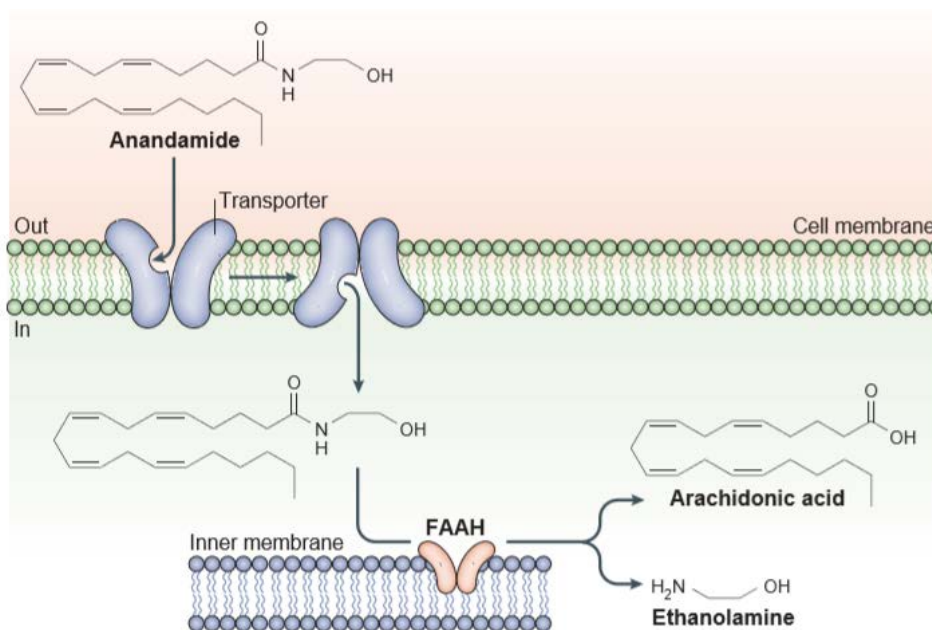
La síntesis de endocannabinoides, AEA y 2-AG se produce en la membrana postsináptica y actúa de forma retrógrada sobre los receptores CB1 situados en el terminal presináptico. Mediante la unión de los endocannabinoides a los receptores CB1, dado su carácter retrógrado, se produce una disminución de la liberación de neurotransmisores, tanto excitatorios como inhibitorios (Pacher, 2000). Diversos trabajos han propuesto que los receptores CB1 y sus ligandos están involucrados en la regulación dopaminérgica de la vía de recompensa mesocorticolímbica. A este respecto, el gen del receptor CB1 (*Cnr1*) ha sido objeto de estudio como partícipe en la vulnerabilidad de la adicción a cocaína. De esta manera, algunas variantes del *Cnr1* se han asociado a una mayor dependencia a las drogas en general y a la cocaína en particular (Zuo, *et al.*, 2007, Zuo *et al.*, 2009). La administración de cannabinoides exógenos modula los efectos de recompensa agudos de la cocaína (Arnold, 2005). A este respecto se ha descrito que agonistas del receptor CB1 como el CP 55,940 muestran capacidad para reducir la hiperactividad locomotora generada por la cocaína (Arnold *et al.*, 1998), mientras que el WIN 55,212-2 reduce su autoadministración (Fattore *et al.*, 1999).

Como sabemos, los agonistas de receptores cannabinoides tienen la capacidad de inhibir la liberación de neurotransmisores en el SNC de los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos, entre otros (Piomelli, 2003). Se ha descrito también que el antagonista del receptor CB1 (SR141716A) reduce la autoadministración de alcohol y opiáceos (Colombo, *et al.*, 2005; Caille y Parsons., 2003). A su vez, tanto en la autoadministración de alcohol, como en la de heroína, se ha observado un efecto sobre los niveles de endocannabinoides en el NAc Shell, elevando los niveles de AEA intersticial en el caso de la heroína y del 2-AG en el caso del alcohol. En este mismo estudio no se apreció ningún efecto sobre AEA o 2-AG en el caso de la autoadministración de cocaína (Caille y Parsons., 2003).

Existen dos mecanismos para atenuar la señalización endocannabinoide en el cerebro. El primero consiste en el transporte selectivo dentro de las llamadas células “*carrier-mediated transport*” y el segundo en la hidrólisis intracelular (Figura 6). El transporte de AEA y 2-AG puede ser por difusión pasiva mediante membranas lipídicas, aunque existe un mecanismo más acelerado por medio de transportadores selectivos “*selective system carrier*” ubicado en las neuronas presinápticas, postsinápticas y en las células gliales (Piomelli, 2003). El otro mecanismo se basa en la amidohidrolasa de ácidos grasos (Faah). Esta serina hidrolasa cataliza la degradación de AEA y 2-AG a etanolamina y ácido araquidónico. También interviene en la hidrólisis de otras amidas grasas, ajenas a los receptores CB1 y CB2, como el factor de saciedad

oleoiletanolamida y el mediador de inflamación palmitoetanolamida (Piomelli, 2003). En el cerebro, la Faah se encuentra en los cuerpos celulares y dendritas del hipocampo, neocórtex y cerebelo (Tsou *et al.*, 1998).

Algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen de Faah han sido asociados con el riesgo de un mayor consumo de alcohol, principalmente en jóvenes que se inician en su consumo (Bühler *et al.*, 2014). Por lo tanto, la variabilidad genética de Faah y de otras enzimas relacionadas con ligandos endocannabinoides se han relacionado con la vulnerabilidad individual ante problemas con el alcohol (Bühler *et al.*, 2014). Se conoce que hay un déficit de la expresión de Faah en ratas con preferencia al alcohol AA (Alko, Alcohol) en la corteza prefrontal, acompañado de una menor actividad de esta enzima (Hansson *et al.*, 2007). Estos últimos autores también encontraron, aunque en menor grado, una reducida expresión de otra enzima relacionada, la Magl (monoacilglicerol lipasa). Estos y otros hallazgos sugieren que la expresión génica de las enzimas que regulan el sistema endocannabinoide puede participar en la vulnerabilidad ante el consumo alcohol (Hansson *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Mecanismo de desactivación de endocannabinoides. AEA puede introducirse en la neurona por medio de mecanismo de transporte de alta afinidad y una vez dentro ser degradada por la enzima Faah a ácido araquidónico y etanolamina. Modificado de Piomelli *et al.* (2003).

### 1.5.5. Proteínas asociadas a sinapsis

La excitabilidad neuronal se basa en el balance entre señales excitatorias e inhibitorias, que depende del equilibrio entre mensajes excitatorios e inhibitorios recibidos por cada neurona. La transmisión sináptica excitadora predominante es mediada por el neurotransmisor glutamato, mientras que la inhibitoria se hace, en gran medida, mediante el GABA. Cada uno de estos dos tipos de sinapsis tiene características propias en cuanto a su estructura. Por ejemplo, en el caso de las sinapsis glutamatérgicas se observa al microscopio un compartimento postsináptico que agrupa a los receptores concentrados en la densidad postsináptica (PSD) o agrupamiento de receptores excitatorios (Keith y Husseini, 2008). La mayoría de las sinapsis glutamatérgicas se realizan sobre protusiones con forma de bulbo, las espinas dendríticas, mientras que la mayoría de las GABAérgicas se realizan sobre el eje dendrítico, el soma y zonas próximas al axón (Keith y Husseini, 2008; Fujiyama *et al.*, 2002).

Los canales iónicos dependientes de voltaje y de ligando postsinápticos se agrupan y ubican en función de interacciones con proteínas intracelulares, los cuales son más abundantes en la PSD (Essrich *et al.*, 1998). Entre esos se encuentran receptores ionotrópicos de la membrana postsináptica que están asociados a un entramado proteico de moléculas con diferentes funciones: anclaje al citoesqueleto (GKAP, Gefirina, PSD-95), enzimas señaladoras y componentes del citoesqueleto entre otras (Sheng y Kim, 2011; Sheng y Hoogenraad, 2007).

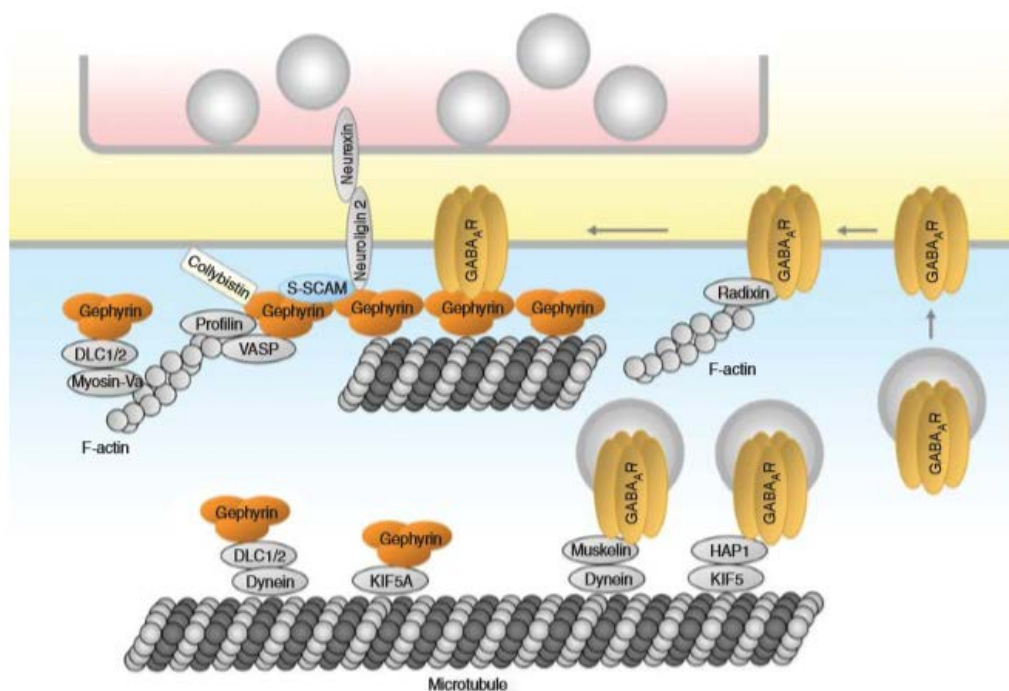
#### 1.5.5.1. Gefirina.

La gefirina es una proteína citosólica con tres dominios y dos funciones conocidas: una estructural, sirviendo de anclaje de receptores de glicina y GABA al citoesqueleto y, otra, sintética, participando en la síntesis del cofactor enzimático del molibdeno en múltiples tejidos (Figura 7).

En el SNC encontramos que la glicina tiene una doble función: inhibidora en las vías glicinérgicas y excitadora en las vías glutamatérgicas, como activador del receptor NMDA. Las sinapsis glicinérgicas se encuentran sobre todo en la médula espinal, en el bulbo raquídeo y en la retina. A su vez, en neuronas presinápticas de NMDA también encontramos receptores de glicina, principalmente en la médula espinal, actuando como un modulador alostérico en dichos receptores glicinérgicos. No obstante, se sabe



también que la gefirina ancla a los receptores GABA al citoesqueleto transmembrana (Kirsh y Beltz, 1995; Kirsh *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1995). A este respecto, la gefirina se ha detectado en el hipocampo asociado a sinapsis GABAérgicas y no a las glutamatérgicas (Craig, *et al.*, 1996). Por ello y por su abundancia en el sistema GABAérgico, se ha propuesto que la gefirina es un indicador de la función inhibitoria en el SNC y se ha estudiado su papel en la presencia de drogas de abuso. Así, en hipocampos de alcohólicos y de adictos a la cocaína se ha observado que, tanto el gen *GABR2* que codifica la subunidad Gamma-2 del receptor de GABA, como el gen *GPHN* que codifica la gefirina, están regulados a la baja. Esta subunidad de GABA es requerida, junto con la gefirina para el agrupamiento postsináptico de los receptores GABA (Enoch, *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Organización de las sinapsis inhibitorias GABAérgicas. Interacciones de la gefirina con proteínas próximas. Este patrón es similar en las sinapsis glicinérgicas. Modificado de Sheng, M. y Kim, E. 2011.

#### 1.5.5.2. PSD-95

La densidad postsináptica (PSD) es un conjunto de proteínas especializadas en la señalización y plasticidad y, que básicamente, está formado por proteínas andamio multidominio. Entre ellas se encuentra la proteína PSD-95 que se localiza en la



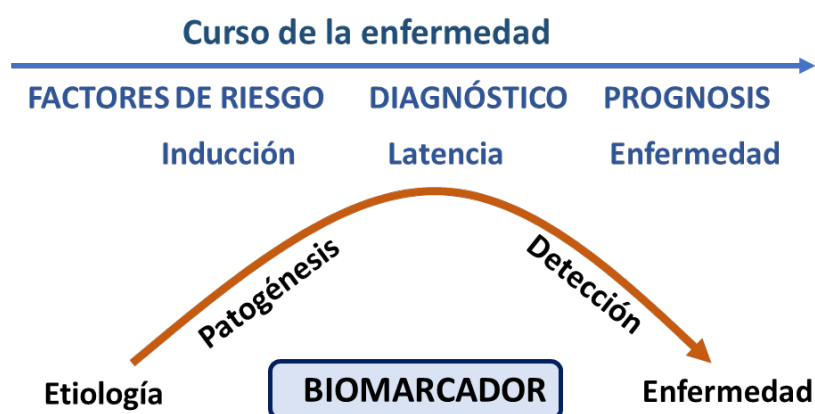
subunidad 2 del receptor N-Metil-D-aspartato (NMDA-2) y los canales K<sup>+</sup> de la sinapsis. Se ha propuesto que la PSD-95, reteniendo selectivamente moléculas de adhesión en sinapsis excitadoras, puede jugar un papel en el equilibrio excitación/inhibición del SNC (Keith y Husseini, 2008).

La proteína PSD-95 se ha asociado con la plasticidad glutamatérgica tras la exposición a drogas de abuso. A este respecto, Yao *et al.* (2004) demostraron en ratones que no expresaban PSD-95 que la cocaína producía un mayor efecto estimulante locomotor y provocaba una disminución de la sensibilización conductual con el paso del tiempo. Estos autores comprobaron que la cocaína indujo una desregulación en la expresión de PSD-95 en el cuerpo estriado, donde estaba especialmente disminuida esta proteína, sobre todo en el caudado putamen y en el NAc. No obstante, no observaron cambios en la corteza ni el hipocampo (Yao *et al.*, 2004).

## 1.6. Biomarcadores de los efectos del consumo de cocaína y/o alcohol

### 1.6.1. Tipos de Biomarcadores

Puede definirse biomarcador como una característica que es objetivamente medible y evaluable y que sirve como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas ante un fármaco o xenobiótico (Naylor, 2003). Según la fase de la patología, los biomarcadores pueden informar sobre factores de riesgo, adelantar el diagnóstico en estadios subclínicos o caracterizar una patología ya diagnosticada facilitando su pronosis (Figura 9) (Mayeux, 2004). Un ejemplo de lo anterior son algunas enfermedades neurológicas de difícil diagnóstico, como la de Alzheimer, donde los biomarcadores contribuyen al diagnóstico temprano, proporcionan herramientas que permiten una clasificación homogénea de la enfermedad y, en general, amplían el conocimiento de la patogénesis (Mayeux, 2004).



**Figura 9.** Potencialidades de los biomarcadores según el curso de la enfermedad. Modificado de Mayeux, 2004.

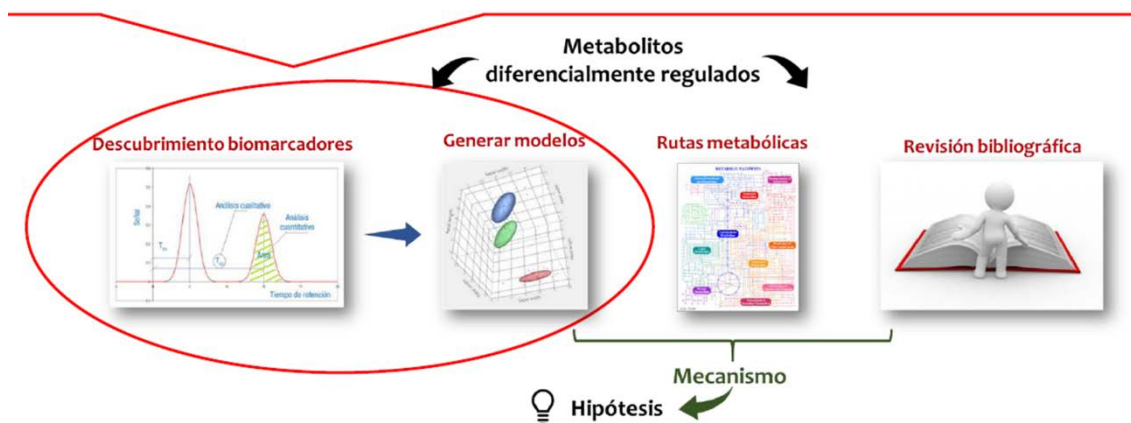
Las mediciones neuroquímicas como marcadores de neurotoxicidad tienen la limitación de la inaccesibilidad del tejido nervioso, lo que hace más necesaria la búsqueda de marcadores que estén presentes en muestras periféricas de más fácil acceso, pero que monitoricen de alguna manera las alteraciones en el tejido nervioso (Costa y Manzo, 1995). Atendiendo a los efectos de agentes externos sobre el organismo, se distinguen tres tipos de biomarcadores: de exposición, de susceptibilidad y de respuesta o efecto (Silbergeld y Davis, 1994). Ante un xenobiótico determinado y según Gil (2000) tendríamos tres tipos de aplicaciones respecto a la información aportada por el biomarcador:

- Susceptibilidad.** Informan sobre la respuesta individual ante el tóxico.
- **Exposición.** Informan sobre la dosis, cuantificando el propio xenobiótico o sus metabolitos.
- **Efecto.** Indican los cambios bioquímicos que se derivan de la exposición ante el xenobiótico.

### 1.6.2. La Metabolómica como herramienta de búsqueda de biomarcadores

La metabolómica busca metabolitos, pequeñas moléculas (<1.500 Da), diferencialmente regulados, que puedan aportar información biológica y/o servir en la diagnosis o prognosis de patologías (Abu Aboud y Weiss, 2013). Para Gómez-Lechón y Cascales (2005) la metabolómica se encarga del estudio del estatus fisiológico de un organismo, órgano, tejido o célula determinados, mediante el análisis de la concentración del número más amplio posible de pequeñas moléculas no proteicas o metabolitos sintetizados endógenamente. El conjunto de metabolitos forma el metaboloma, que se podría definir como el conjunto completo y dinámico de metabolitos presentes en un organismo en un estado concreto. Los metabolitos pueden ser propios de los procesos metabólicos internos, o bien ser incorporados desde fuera. Beecher (2003) aporta otra definición de metabolómica como la ciencia que caracteriza un estado fisiológico concreto mediante la determinación de la concentración de sus pequeñas moléculas que constituyen el metabolismo.

Los estudios comparativos del metaboloma, entre sujetos con una patología y sus controles, permiten detectar y analizar de forma muy sensible la naturaleza de cualquier cambio de la fisiología celular o tisular. La investigación de la toxicidad por xenobióticos se vale de la metabolómica como estrategia de búsqueda de biomarcadores que contribuyan a una mejor comprensión de los efectos fisiopatológicos de un agente externo.



**Fig. 10.** Proceso seguido en los estudios de tipo metabolómico.

La metabolómica no termina con el hallazgo de metabolitos diferencialmente regulados, si no que permite explorar rutas metabólicas y generar modelos que expliquen las diferencias en el fenotipo. Por tanto, el conjunto de técnicas y procedimientos reunidos en torno a la metabolómica se configura como una herramienta funcional que integra los factores genéticos, ambientales y xenobióticos (Guo, *et al* 2015). Entre sus aplicaciones más inmediatas destaca la detección rápida de toxicidad *in vivo* (Robosky *et al.*, 2002); estado de una enfermedad; o la eficacia de un fármaco (Gómez-Lechón y Cascales, 2005). EL proceso de búsqueda de biomarcadores se esquematiza en la Figura 10.

### 1.6.3. Biomarcadores y drogas de abuso

Tanto en cocaína, como sobre todo en alcohol, se han buscado biomarcadores que informen de alteraciones moleculares o bioquímicas cuantificables y que estén presentes en tejidos, sangre, orina o líquido cefalorraquídeo. Esta búsqueda de metabolitos es incluso anterior al término metabolómica y a la aparición de la metodología analítica moderna que le da soporte. Ante la aparición de una nueva droga de diseño, como son los cannabinoides sintéticos o los derivados de anfetaminas, los estudios metabolómicos son una herramienta que aporta información sobre su toxicidad o sus mecanismos de acción. Por lo tanto, la metabolómica ha sido ampliamente utilizada, no sólo para avanzar en las claves de la dependencia de las drogas, sino también para progresar en el conocimiento de los efectos agudos de las drogas de abuso (Zaitzu *et al.*, 2016).

Los metabolitos encontrados diferenciados tras la exposición a drogas, tanto en animales como en humanos, están relacionados con múltiples procesos fisiológicos

como estrés oxidativo, función sináptica y neurotransmisión, metabolismo energético y degradación de proteínas, entre otros.

#### **1.6.3.1. Cocaína**

Además del interés que tiene encontrar metabolitos diferenciados tras la exposición a cocaína por su valor toxicológico, es de gran relevancia comprobar si alguno de estos metabolitos, candidato a biomarcador, puede aportar valor predictivo sobre los valores de variables conductuales relacionadas con el consumo de dicha droga. A continuación, se detallan algunos trabajos y rutas metabólicas exploradas mediante estrategias metabólicas en distintos tipos de matrices: plasma-suero, orina y tejido encefálico.

#### **Plasma-suero y orina**

Las muestras de sangre, plasma o suero, y orina se obtienen con facilidad y presentan la ventaja de una más fácil conversión de los hallazgos en aplicaciones clínicas, dado que las moléculas candidatas a biomarcador obtenidas en modelos animales poseen una posible translación a humanos. En comparación con las muestras de sangre, las de orina poseen, generalmente, una mayor concentración de sustancias de interés toxicológico y sus metabolitos se mantienen por periodos de tiempo más largos en dicha matriz, proporcionando información sobre la absorción y metabolización. Las drogas de abuso más conocidas desaparecen de la sangre en 8-24 horas después de la absorción, mientras que en orina el periodo es más variable de 12 horas a 30 días y, generalmente se encuentran trazas dos o tres días después del consumo (Hawks y Chiang, 1986).

Patkcar *et al.*, (2009) realizaron un estudio explorando las rutas metabólicas del triptófano, las purinas, la tirosina y el estrés oxidativo en pacientes abstinentes que estaban bajo tratamiento por problemas de adicción a la cocaína. Los autores encontraron que los adictos a la cocaína mostraban significativamente elevados los niveles plasmáticos de N-metil serotonina y guanina y reducidos en xantina, hipoxantina y antranilato, en comparación con personas controles. Al relacionar dichos metabolitos con el Índice de Severidad de la Adicción (ASI), en un primer análisis multifactorial, encontraron que la n-metil serotonina más la xantina aportaban el 73% de la varianza en la predicción de las puntuaciones del ASI y la n-metil serotonina por si misma era candidata para actuar como biomarcador de severidad de la adicción a la

cocaína. La N-metil serotonina es un producto de la degradación del neurotransmisor serotonina que tiene propiedades psicomiméticas y que al igual que otro producto de la serotonina como la Bufotenina es un biomarcador de patologías psiquiátricas (Takeda *et al.*, 1995).

Por su parte, Zaitsu *et al.* (2014) aplicaron técnicas propias de la metabolómica no dirigida en muestras de plasma y orina en ratas estudiadas en el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) inducido por cocaína, anfetamina y morfina. Las muestras de plasma procedentes de los sujetos condicionados con cocaína mostraron cuatro metabolitos (L-treonina, cistina, N-propilamina y espermidina) significativamente diferenciados respecto a los controles. En el caso de la morfina, los autores encontraron que el perfil metabólico predecía el valor del test CPL (diferencia entre los tiempos de permanencia en ambos contextos). La treonina, por su parte, es un aminoácido con propiedades como protector del estrés y potenciador de la respuesta inmunitaria. La epermidina también aparece alterada en el plasma de los sujetos con otras drogas como metanfetamina (Zaitsu *et al.*, 2014) o alcohol Sánchez-López., 2017).

### Estructuras encefálicas

Además de en orina y en plasma, también se ha estudiado los efectos de la cocaína sobre el metaboloma de diferentes áreas neurales (Li *et al.*, 2012, Kaplan *et al.* 2013, Zhang *et al.*, 2016). Las áreas con una mayor relevancia en el circuito neural del refuerzo mesocorticolímbico, han sido en las que principalmente se han centrado estos trabajos: NAc y cuerpo estriado en los de Li *et al.* (2012), tálamo, cuerpo estriado y CPF en los de Kaplan *et al.*, (2013) y cuerpo estriado, CPF y NAc en los de Zhang *et al.*, (2016).

Li *et al.* (2013) observaron diferencias entre la exposición o no a cocaína en el NAc y estriado en los siguientes metabolitos: GABA, glutamato, N-acetil.aspartato, lactato, colina, fosfocolina y glicerol. Algunas de estas moléculas podrían estar implicadas en estrés oxidativo como el lactato o en la desregulación mitocondrial como la fosfocolina (Shenkel y Bakovic, 2014). Estos autores apreciaron diferencias entre los sujetos que habían pasado por CPL y los que no, con lo que puede pensarse que este condicionamiento afecta a las variaciones metabólicas.

En sus estudios Kaplan *et al.*, (2013) observaron un importante efecto de la cocaína sobre el metabolismo de la glucosa y aminos biogénicas. Estos autores detectaron, mediante TEP (tomografía por emisión de positrones) cambios en la

glicolisis en el tálamo. Algunos de estos metabolitos parecen estar involucrados en el estrés oxidativo. Como sabemos, tanto astrocitos como neuronas, utilizan sus propios mecanismos celulares para la obtención de energía, por lo que la glucosa, el lactato, el piruvato acetato, el glutamato y la glutamina son algunos de los compuestos susceptibles de sufrir oxidación en las células cerebrales (Zielke *et al*, 2009).

#### 1.6.3.2. Alcohol

Aunque los procesos metabólicos del alcoholismo han sido estudiados desde hace muchas décadas, no ha sido hasta la aparición de metodologías analíticas muy eficientes e intensivas cuando se ha comenzado a realizar estudios de tipo metabolómico en este campo. Los hallazgos sobre alteraciones metabólicas, obtenidos de las diferentes estrategias de búsqueda de perfiles metabólicos, han ayudado a comprender mejor los efectos del alcohol sobre el organismo y revelar nuevos mecanismos de toxicidad (Gika y Wilson, 2014). Las tecnologías analíticas más empleadas han sido, Resonancia magnética nuclear de protón (H-RMN), Cromatografía de gases acoplada a masas (GC – MS) y Cromatografía líquida acoplada a masas (LC – MS), que se han aplicado en la búsqueda de perfiles metabólicos alterados en suero, plasma, orina y tejidos, procedentes de modelos animales o humanos, después de la exposición al alcohol. A continuación, se resumen brevemente algunos de estos trabajos.

Gika *et al.*, (2012) examinaron mediante LC-MS los perfiles metabólicos en orina y plasma de ratas y ratones que recibieron alcohol durante dos y cuatro semanas por vía intragástrica. Los efectos a las cuatro semanas fueron más intensos que a las dos semanas, en cuanto a metabolitos diferenciados respecto a los controles. Observaron, por ejemplo, que en plasma de ratón estaban alterados la glicerofosfocolina y glicerofosfoserina. Estos autores apreciaron en orina el efecto de la exposición al alcohol sobre dos aminoácidos, taurina y arginina y un derivado la hidroxiprolina. Observaron, a su vez, alteraciones en moléculas del metabolismo del triptófano, 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y el ácido xanturénico. Como sabemos la ruta metabólica del triptófano tiene un gran interés por ser el precursor de la síntesis de serotonina, neurotransmisor con un importante papel en el consumo crónico de alcohol. También, es conocido que la exposición prolongada al alcohol produce alteraciones en la transmisión serotoninérgica en la corteza cerebral (Pandey, 1992).

Por su parte, Nicholas *et al.* (2008) mediante un análisis metabolómico, empleando H-MNR como estrategia analítica, observaron que el alcohol inducía

cambios en metabolitos de importantes rutas metabólicas como la de neoglucogénesis en hígado, sangre y cerebro de ratas previamente expuestas, tanto a una dosis única de alcohol, como tras un protocolo de cuatro días seguidos. Algunas de las alteraciones observadas, ya fuera en el caso de una administración única o en el de cuatro sesiones fueron una bajada de glucosa, lactato y alanina en suero e hígado y un incremento de acetato en hígado y suero. El tratamiento crónico produjo un aumento en hígado de el D- $\beta$ -hidroxibutirato (un cuerpo cetónico que participa en el metabolismo energético) y un descenso de betaína. Estos hallazgos son acordes con otros estudios en los que el alcohol de forma aguda estimula la utilización hepática de la alanina para la gluconeogénesis (Cohen *et al*, 1979).

Igualmente, Masuo *et al.* (2009) realizaron un amplio estudio, que implicó además de la metabolómica a la transcriptómica y a la proteómica, sobre los efectos que la ingesta crónica de una bebida alcohólica japonesa. Su modelo animal consistió en ratas hembra con acceso libre a una bebida con el 15 % de alcohol durante 12 meses, comparadas con otro grupo de ratas con acceso a una bebida azucarada de igual valor calórico como control. En tejido cerebral observaron una disminución significativa en las concentraciones de GABA, isoleucina, N-acetil aspartato, taurina y glutamato, junto con aumentos en las cantidades de aminoácidos como la valina, arginina, ornitina, alanina, glutamina y la colina. A su vez, en hígado se apreciaron diferencias en ácidos biliares y glucosa.

Como bien conocemos, el seguimiento clínico de las lesiones hepáticas inducidas por una exposición prolongada al alcohol podría beneficiarse del descubrimiento de biomarcadores que alertaran del progreso de la hepatopatía. Con este propósito Fernando *et al.*, (2011) intentaron localizar posibles indicadores poniendo el foco de atención en el metaboloma lipídico del plasma e hígado de ratas que, además del alcohol, recibían una dieta de alto contenido graso, empleando H-RMN como técnica analítica. Encontraron reducida la relación colesterol libre/esterificado y observaron un descenso de los ácidos grasos libres, ésteres metílicos de ácidos grasos y un aumento de triglicéridos. Este tipo de datos podrían ser de interés en futuros estudios clínicos similares.

#### **1.6.3.3. Cocaína y alcohol**

Son escasos los estudios que, empleando estrategias de tipo metabolómico, se hayan realizado para estudiar el perfil de metabolitos diferenciados tras la exposición a la combinación de cocaína y alcohol. Mediante metabolómica no dirigida, Sánchez-



López *et al.*, (2017) investigaron los efectos de la administración intravenosa crónica, individual y combinada de cocaína o/y alcohol sobre los perfiles metabólicos plasmáticos de ratas Wistar. Encontraron ocho metabolitos significativamente alterados, principalmente relacionados con el metabolismo de diferentes aminoácidos como triptófano, arginina, prolina, metionina o cisteína, entre otros. Estos resultados demostraron que la exposición crónica a la cocaína y / o al alcohol podría afectar las rutas metabólicas de diferentes aminoácidos.

#### **1.6.3.4. Aminoácidos libres en plasma como biomarcadores en el Sistema Nervioso Central**

Los aminoácidos son los componentes básicos de las proteínas y los precursores de las biomoléculas que contienen nitrógeno. Además, desempeñan un importante papel en la neurotransmisión (Fagg y Foster, 1983), en el sistema endocrino y en el sistema inmune (Li *et al.*, 2007), entre otros. Las alteraciones en los niveles de aminoácidos presentes en el plasma han sido propuestas como biomarcadores potenciales para el diagnóstico de enfermedades neuropsiquiátricas como el autismo, la depresión grave o el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDH) (Altamura *et al.*, 1995; Zavala *et al.*, 2001). En sujetos con esquizofrenia, por ejemplo, se ha comprobado que los niveles de glutamato están más elevados respecto a sus controles (Altamura *et al.* 1993).

Como sabemos, el glutamato y aspartato son considerados los principales aminoácidos transmisores excitadores en el SNC y, en el caso del glutamato es bien conocida su destacada función importante en el alcoholismo. Así, la exposición prolongada al alcohol aumenta el número de receptores NMDA como un mecanismo de regulación positiva de inhibición ante el efecto agudo de esta sustancia (Xiang *et al.* 2015).

Por su parte, la taurina es un  $\beta$ -aminoácido sulfonado derivado de la cisteína que contiene el grupo tiol y está presente en grandes cantidades en tejidos excitables como el cerebro o el corazón. Se le atribuyen funciones como neuroprotector, antioxidante, osmorregulador y regulador del calcio (revisado por Olive, 2002). Algunas de las acciones de la taurina sobre el SNC son las siguientes:

- Potenciación de la función del receptor GABAA.
- Potenciación del receptor de glicina.
- Inhibición de la función del receptor de aminoácidos excitadores

- Inhibición de la función de los canales del calcio.

La taurina ayuda a compensar los efectos adversos del alcohol. En un modelo animal de abstinencia, se ha comprobado que una inyección de taurina mantiene o restablece los niveles de glutamato en el NAc (Dahchour y De Witte, 2000).

A su vez, la alanina es uno de los productos generados por aminación tras la reducción del piruvato. En el músculo el piruvato de la glucólisis se transforma en alanina a expensas del glutamato y en el hígado se regenera el piruvato para la glucogénesis y el amonio del glutamato puede convertirse en urea. Hay datos que han demostrado que en ratas la alanina plasmática se ve disminuida respecto a sus controles, tras la exposición aguda y crónica al alcohol (Hagman y Eriksson, 1990).

En relación a la L-serina, sabemos que es un aminoácido que se cataliza a partir de otros aminoácidos neuroactivos como la glicina, la cisteína, la taurina o de otras moléculas como proteínas, lípidos de membrana o nucleótidos (Acosta, 2006). Este aminoácido tiene funciones como factor neurotrófico muy importante para el desarrollo del SNC (Hirabayashi, 2012). La enzima serina racemasa sintetiza D-serina a partir de la L-serina. Al igual que la glicina, la D-serina puede actuar como coagonista del subtipo de receptor NMDA del glutamato, uniéndose al lugar de glicina con una función reguladora del receptor. En la clínica con humanos se tiene constancia de casos de pacientes con desórdenes psiquiátricos donde se encontraban disminuidos los niveles de L-serina y glicina (Acosta, 2006).

Es conocido también que la arginina es un importante transportador de nitrógeno del organismo. Su síntesis se realiza fundamentalmente en el riñón a partir de citrulina adsorbida por el intestino y de un donante de nitrógeno, que puede ser otro aminoácido como el aspártico (De Luis, 2009). La arginina sirve como precursor para la síntesis de proteínas, creatinina y del óxido nítrico. Desde un punto de vista toxicológico, la arginina participa en la detoxificación de los grupos amonio. Se ha propuesto que los niveles plasmáticos de L-arginina podrían ser utilizados como un biomarcador de la depresión, dado que se ha comprobado que niveles elevados de este aminoácido apuntan a un mayor riesgo de sufrir esta psicopatología (Mayoral-Mariles *et al.* 2012).

Los trabajos donde se han cuantificado el perfil plasmático de aminoácidos, tras la administración de una sustancia psicoactiva han sido principalmente sobre el alcohol. Así, Abdel-Nabi *et al.*, (1995) cuantificaron treinta y seis metabolitos, entre aminoácidos y otras monoaminas, en plasma y en otros tejidos (aorta y páncreas) en ratas, treinta minutos después de una inyección intraperitoneal de alcohol.

Comprobaron que los sujetos que recibieron alcohol contaban, en general, con valores más bajos de la mayoría de aminoácidos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el caso de alanina, arginina, ácido aspártico, glicina, fenilalanina y serina. Por su parte, Hagman y Eriksson (1990) observaron durante la administración aguda de alcohol, una reducción similar en las concentraciones de aminoácidos que era dosis-dependiente. En un trabajo posterior, Hagman y Eriksson (1991) encontraron que el agotamiento de los aminoácidos observado durante la administración aguda, se revirtió, al menos en parte, durante la exposición mantenida de forma crónica. Las concentraciones plasmáticas de alanina, glicina, arginina y tirosina aumentaron durante la administración prolongada. Este efecto podría deberse, según los autores, al desarrollo de diferentes mecanismos de tolerancia.

Finalmente, Tennant *et al.* (1985) observaron una reducción media del 20% de la tirosina en plasma en los consumidores de cocaína, en comparación con sus controles, así como un valor menor de los esperado en la proporción de Tirosina / Fenilalanina. El valor de esta ratio (Tyr/Phe) en la población general, normalmente es algo superior a uno (Mayoral-Mariles *et al.*, 2012; Forteschi *et al.*, 2015).

Por lo expuesto hasta aquí en esta Introducción de los hallazgos de la literatura científica relacionada con la temática de la presente Tesis Doctoral, hemos considerado necesario el establecimiento de un modelo animal que nos permitiera estudiar, en las condiciones experimentales de un laboratorio, el policonsumo de cocaína y alcohol. Dicho establecimiento se ha realizado mediante aproximaciones sucesivas, hasta conseguir que animales de ambos sexos se autoadministraran intravenosamente una combinación de esas dos drogas. El hecho de que sea factible la autoadministración conjunta de ambas drogas es relevante, dado que el paradigma de la autoadministración intravenosa de drogas es el mejor modelo animal que remeda la drogadicción humana. Además, en los animales expuestos a las dos drogas, hemos estudiado los posibles cambios biológicos inducidos por esa presencia conjunta de ambas sustancias y, a tal fin, hemos analizado el plasma sanguíneo, por su enorme valor translacional, y también tejido cerebral de regiones anatómicas que parecen estar implicadas en la drogadicción, con el objetivo de estimar el posible efecto de esos policonsumo sobre sistemas de neurotransmisores de gran importancia como son los de glutamato y el GABA (por ser los neurotransmisores que intervienen en un 80% de toda la comunicación nerviosa) y el sistema endocannabinoide (cuyos receptores CB1 son los más abundantes en el sistema nervioso) El planteamiento en el que nos hemos basado para llevar a cabo esta Tesis Doctoral se presenta a continuación.



## 2. Planteamiento de la Investigación





Como se acaba de decir, consideramos que el consumo crónico conjunto de cocaína y alcohol puede dar lugar a cambios metabólicos y afectar a elementos reguladores de sistemas de neurotransmisores como el de GABA, glutamato y endocannabinoide. Por ello, la hipótesis de trabajo que nos planteamos en la presente Tesis Doctoral, así como los objetivos llevados a cabo para contrastar dicha hipótesis se describen a continuación.

## **2.1. Hipótesis**

- Los desequilibrios metabólicos originados por la exposición crónica a cocaína, alcohol o a su combinación, pueden tener un reflejo en metabolitos como los aminoácidos, que pueden ser observables en plasma de animales adultos y jóvenes-adultos de ambos sexos.
- La exposición crónica a cocaína, alcohol o a su combinación puede modificar la expresión génica de receptores de los sistemas de neurotransmisión glutamatérgica, GABAérgica y endocannabinoide, así como la relación entre proteínas PSD-95 y gefirina en determinadas regiones del sistema mesocorticolímbico de animales jóvenes-adultos de ambos sexos.
- Los patrones de adquisición y mantenimiento de la conducta de autoadministración intravenosa y conjunta de cocaína y de alcohol pueden ser diferentes de los de la conducta de autoadministración intravenosa de cocaína sola en animales jóvenes-adultos de ambos sexos.

## 2.2. Objetivos

### 2.2.1. Objetivos del Estudio I

**OBJETIVO I.A.** Establecer una metodología para la exposición crónica por vía intravenosa a cocaína, alcohol y a la combinación de ambas sustancias en la rata Wistar, que simule características propias de los modelos de autoadministración intravenosa de drogas de abuso.

**OBJETIVO I.B.** Analizar las concentraciones plasmáticas de nueve aminoácidos en ratas Wistar macho adultas (95 días) tras la administración crónica (21 días) por vía intravenosa de: i) suero salino; ii) cocaína (15mg/kg p.v.); iii) alcohol (2g/kg p.v.); y iv) cocaína+alcohol (2gr/kg p.v.+ 15 mg/kg p.v.).

### 2.2.2. Objetivos del Estudio II

**OBJETIVO II.A.** Determinar la expresión de genes de receptores de los sistemas de señalización GABAérgico, glutamatérgico y endocannabinoide en cuatro estructuras (corteza prefrontal medial, hipocampo, núcleo accumbens y amígdala) en ratas Wistar, machos y hembras jóvenes (48 días), tras la administración crónica (21 días) por vía intravenosa de: i) suero salino; ii) cocaína (15mg/kg p.v.); iii) alcohol (2g/kg p.v.); y iv) cocaína+alcohol (2gr/kg p.v.+ 15 mg/kg p.v.).

**OBJETIVO II.B.** Analizar las proteínas sinápticas de anclaje gefirina y PSD-95 en cuatro estructuras cerebrales (corteza prefrontal medial, hipocampo, núcleo accumbens y amígdala) en ratas Wistar, machos y hembras Jóvenes (48 días), tras la administración crónica (21 días) por vía intravenosa de: i) suero salino; ii) cocaína (15mg/kg p.v.); iii) alcohol (2g/kg p.v.); y iv) cocaína+alcohol (2gr/kg p.v.+ 15 mg/kg p.v.).

**OBJETIVO II.C.** Estudiar el perfil plasmático de aminoácidos en ratas Wistar, machos y hembras Jóvenes (48 días), tras la administración crónica (21 días)



por vía intravenosa de: i) suero salino; ii) cocaína (15mg/kg p.v.); iii) alcohol (2g/kg p.v.); y iv) cocaína+alcohol (2gr/kg p.v.+ 15 mg/kg p.v.).

**OBJETIVO II.D.** Evaluar el perfil plasmático de aminoácidos en rata Wistar, machos y hembras adultas (95 días), tras la administración crónica (21 días) por vía intravenosa de: i) suero salino; ii) cocaína (15mg/kg p.v.); iii) alcohol (2g/kg p.v.); y iv) cocaína+alcohol (2gr/kg p.v.+ 15 mg/kg p.v.).

**OBJETIVO II.E.** Determinar las concentraciones plasmáticas de los metabolitos propios de la metabolización de la cocaína y alcohol en ratas Wistar, machos y hembras Jóvenes (48 días), tras la administración crónica (21 días) por vía intravenosa de: i) suero salino; ii) cocaína (15mg/kg p.v.); iii) alcohol (2g/kg p.v.); y iv) cocaína+alcohol (2gr/kg p.v.+ 15 mg/kg p.v.).

### 2.2.3. Objetivos del Estudio III

- **OBJETIVO III.A.** Valorar si la autoadministración crónica (21 días) por vía intravenosa de la combinación de cocaína y alcohol (1mg/kg p.v./inyección + 133mg/kg p.v./inyección) tuviera características comparables, en cuanto a adquisición y mantenimiento, a las de la autoadministración de cocaína sola (1mg/kg p.v./inyección), así como si hubiera patrones sexodimorfos en esas conductas de ratas macho y hembra de la cepa Wistar de 52 días de edad.
- **OBJETIVO III.B.** Estudiar el perfil plasmático de aminoácidos tras la autoadministración crónica (21 días) por vía intravenosa en ratas machos y hembras de la cepa Wistar de 52 días de edad de los siguientes tratamientos: i) suero salino; ii) cocaína (1mg/kg p.v. inyección); y iii) cocaína conjuntamente con alcohol (1mg/kg p.v. /inyección + alcohol (133mg/kg p.v./inyección).

El abordaje experimental que se planteó para tratar de cumplir estos objetivos se describe en el siguiente apartado de Material y Métodos.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





### 3.1. Diseño experimental general

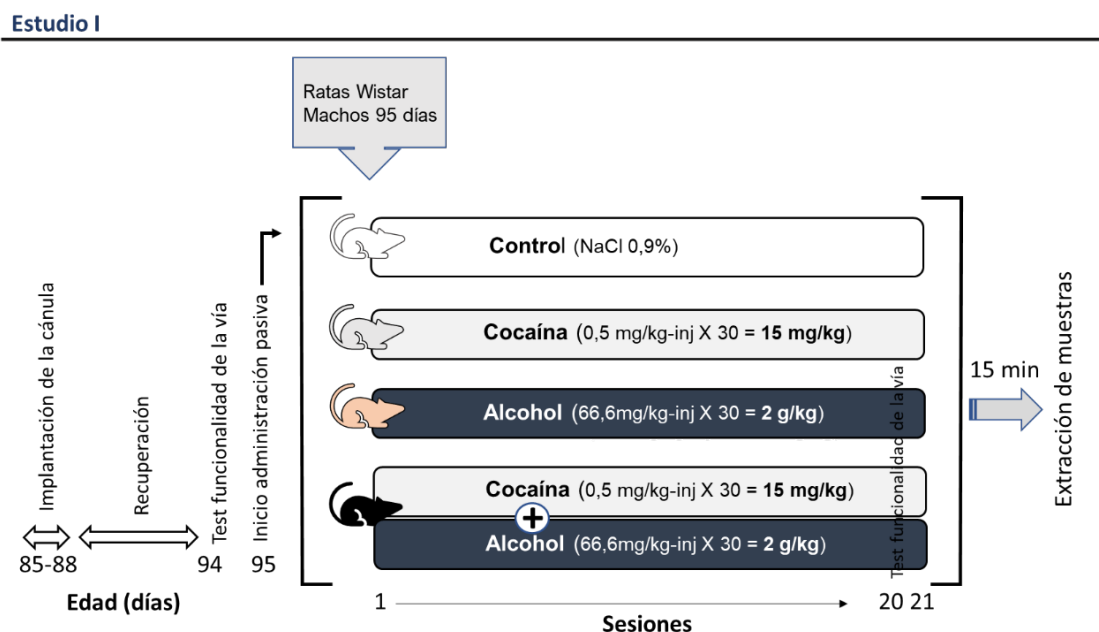
Este trabajo se encuadra en un contexto más amplio en el que, mediante la aplicación de estrategias de metabolómica en modelos animales de poliabuso de cocaína y alcohol desarrollados en el Departamento de Psicobiología de la UNED, se ha intentado estudiar el efecto que la autoadministración conjunta de alcohol y cocaína pudiera tener sobre los metabolitos de dos matrices importantes en el organismo, el plasma sanguíneo y el cerebro. Los elevados recursos técnicos y humanos que se requieren para esta finalidad han sido reunidos gracias a la colaboración entre distintos centros, afectando a cuatro Universidades, UCM, UNED, UAH y UCLM.

Los estudios recogidos en la presente Memoria de Tesis Doctoral se desarrollaron, cronológica y experimentalmente, en tres fases o etapas. En una primera fase (Estudio I), se lleva a cabo una prueba piloto con ratas macho adultas de la cepa Wistar, que recibieron de forma pasiva y por vía intravenosa: cocaína, alcohol, cocaína+alcohol y suero salino. En este primer experimento, además de comprobar si era posible la administración conjunta de cocaína y alcohol mantenida durante 21 días, se cuantificó un grupo de aminoácidos plasmáticos de gran interés fisiológico. En una segunda etapa (Estudio II), con una administración pasiva de los tratamientos igual a la de la primera fase, se incluyó en el diseño experimental a ratas machos y hembras y en dos periodos de su desarrollo, jóvenes-adultas y adultas. En la tercera etapa (Estudio III) se cambió la metodología de administración de las drogas, pasando a un modelo de autoadministración intravenosa y utilizándose como sujetos experimentales ratas Wistar jóvenes-adultas de ambos sexos de 52 días al inicio de los tratamientos. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con la directiva sobre bienestar animal (2010/6 EU) y del Real Decreto 53/2013 que regula la investigación animal y fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Nacional de Educación a Distancia.

#### 3.1.1. Estudio I

En esta primera fase, que tuvo características de estudio piloto, se implementó y puso a prueba una metodología para la administración pasiva, crónica y simultánea de cocaína y alcohol por vía intravenosa, que simulara algunas de las características de los modelos de autoadministración de drogas. El modelo se probó en ratas macho adultas de la cepa Wistar con los siguientes grupos experimentales: i) Coc (15mg/kg p.v.), ii) Alc (2gr/kg p.v.), iii) C+A (2gr/kg p.v.+ 15 mg/kg p.v.) y iv) Control-Salino.

Finalizadas las veintiuna sesiones programadas, se cuantificaron los niveles plasmáticos de nueve aminoácidos. En la Figura 11 se muestra el desarrollo experimental y el cronograma de este estudio.



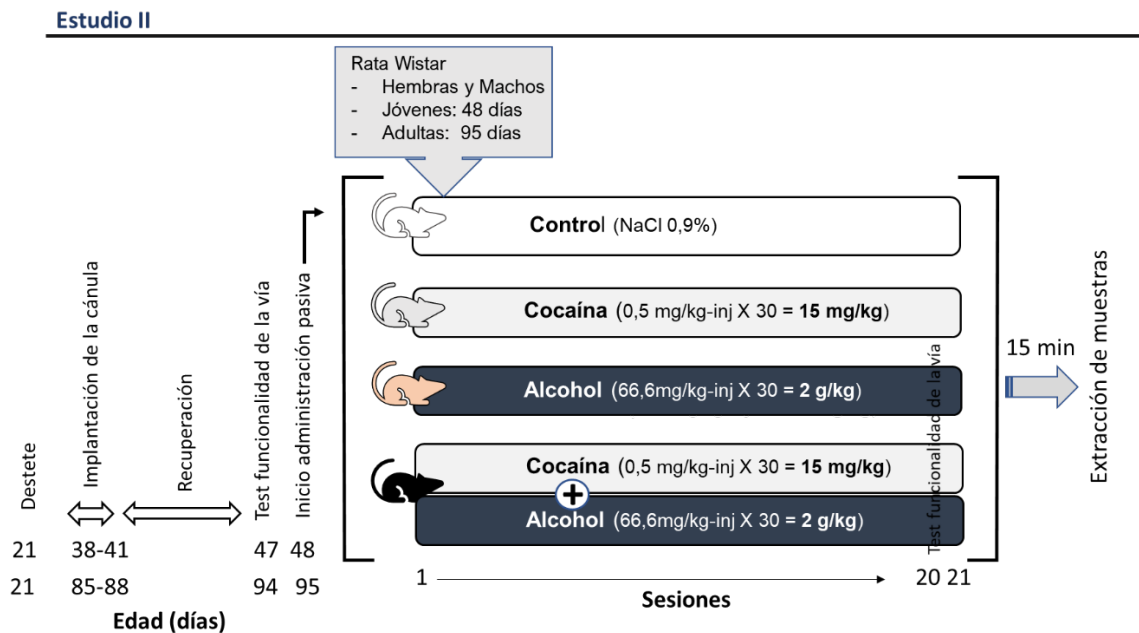
**Figura 11.** Diseño experimental y cronograma de las distintas etapas del Estudio I.

### 3.1.2. Estudio II

En la fase II, empleando la metodología, dosis y tratamientos del Estudio I, se evaluaron distintas variables metabólicas y neurobiológicas en ratas machos y hembras que se encontraban en dos etapas de su desarrollo, jóvenes-adultas (48 días) y adultas (95 días al inicio del tratamiento). Una vez finalizadas las veintiuna sesiones de administración, en estas muestras de plasma recogidas tras la finalización de la última sesión, se cuantificaron once aminoácidos mediante electroforesis capilar con detección inducida por láser (EC-LIF), cuyos hallazgos se describen en el punto 4.2.4. También sobre estas muestras de plasma, por medio de LC-MS (LC, Cromatografía Líquida; MS, Espectrometría de Masas) se obtuvo un perfil de los metabolitos propios del proceso metabólico de la cocaína y de los generados por la presencia de ésta con la del alcohol (ver apartado 4.2.3).

Se extrajeron, a su vez, muestras de tejido procedente de cuatro regiones encefálicas de la vía mesocorticolímbica: CPFm, NAc, Hipocampo y Amígdala. En estas cuatro estructuras se determinó la expresión de ARNm de genes que codifican diversas subunidades de receptores de GABA, NMDA y AMPA. Además de la expresión del receptor CB1, en el sistema endocannabinoide se incluyó la expresión de enzimas

relacionadas con la biosíntesis y degradación de neurotransmisores endocannabinoides. Por otro lado, se cuantificaron mediante Western blot dos proteínas de aclaje presentes en la sinapsis y relacionadas con receptores de GABA y NMDA, la gefirina y PSD-95. En la Figura 12 se muestra el desarrollo experimental y el cronograma de este estudio.

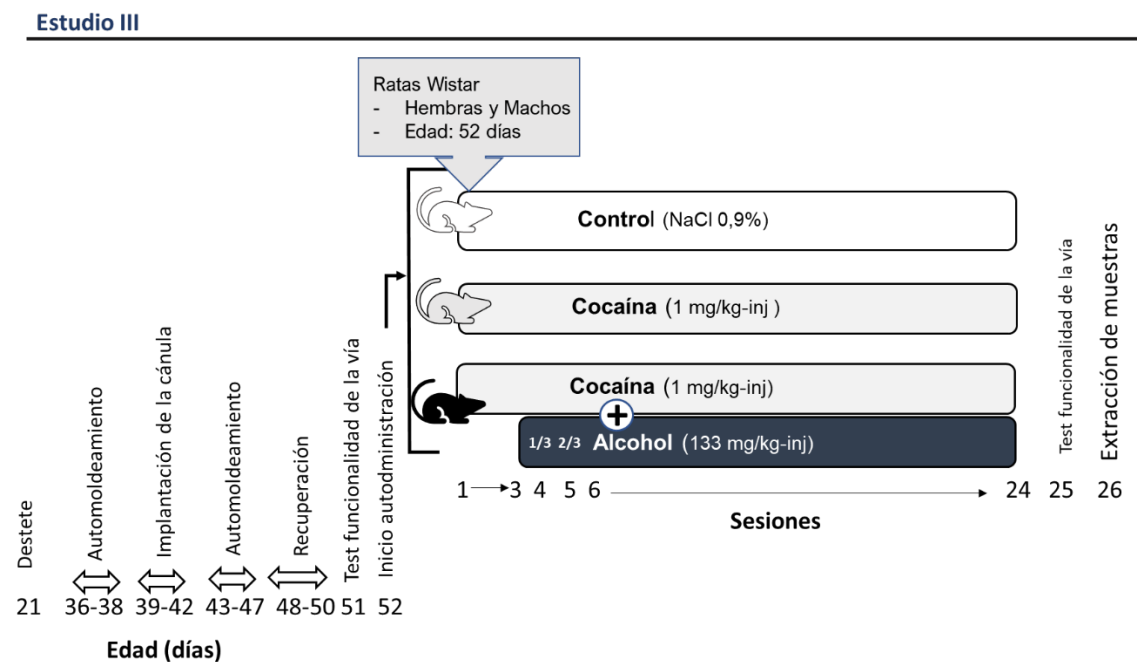


**Figura 12.** Diseño experimental y cronograma de las distintas etapas del Estudio II.

### 3.1.3. Estudio III

En este tercer estudio se cambió la administración pasiva, empleada en los dos primeros, por la de la autoadministración intravenosa, por ser un modelo más ecológico que está reconocido como el mejor modelo animal capaz de remedar la drogadicción en humanos. En este tercer estudio no se incluyó el grupo alcohol, dadas las bajas tasas de respuestas que, en este modelo, refleja la literatura científica. Se emplearon ratas Wistar de 52 días al inicio de la primera sesión de autoadministración, de ambos sexos. El primer objetivo fue estudiar los patrones de adquisición y mantenimiento de la conducta de autoadministración de cocaína junto con alcohol. El grupo cocaína, sustancia ampliamente estudiada mediante este modelo, actuaría como referencia. Se incluyeron ratas machos y hembras para comprobar si pudiera existir un dimorfismo sexual. Como segundo objetivo se han estudiado los efectos que este policonsumo pudiera tener sobre las concentraciones plasmáticas de catorce

aminoácidos. En la Figura 13 se muestra el desarrollo experimental y el cronograma de este estudio.



**Figura 13.** Diseño experimental y cronograma de las distintas etapas del Estudio III.



### 3.2. Elección de las dosis empleadas

La dosis por sesión de cocaína (15 mg/kg p.v.; grupos Coc y C+A) se eligió en base a estudios previos de autoadministración intravenosa de esta sustancia en el Laboratorio de Psicobiología de la UNED (Miguéns *et al.*, 2008). En este trabajo se administró una dosis de un 1mg/kg p.v. de cocaína para cada respuesta (presión de palanca activa) en sesiones de 120 minutos y se obtuvo una media de  $16 \pm 2.4$  respuestas válidas. Por otro lado, se tuvo en cuenta que la dosis de cocaína empleada en estudios farmacológicos en ratas expuestas a la combinación de cocaína más alcohol varía en un rango que va desde 6,6 -15 mg/kg p.v. (i.v.) (Pan y Hedaya, 1999b) a 30 mg/kg p.v. (i.p.) (Pan y Hedaya, 1999c). De acuerdo con todo lo anterior, la elección fue de 15mg/kg p.v. para una sesión de 105 minutos de duración. En el caso de la elección de la dosis empleada de alcohol (2gr/kg p.v./sesión; grupos Alc y C+A) se recurrió a la abundante bibliografía existente en ensayos toxicológicos con alcohol etílico, y en los que se prueban diferentes dosis y vías de administración. Para este estudio se eligió una dosis de 2gr/kg p.v./día, utilizada ampliamente en modelos de exposición crónica al alcohol de varias semanas de duración (Kozawa *et al.*, 2007). Para el Estudio III, donde la administración fue voluntaria, se limitó el número de respuestas efectivas a 15, pero con las concentraciones de cada tratamiento calculadas para que con este número de respuestas se obtuvieran las mismas dosis acumuladas por sesión que en los Estudios I y II, donde la administración fue pasiva.

### 3.3. Desarrollo del Estudio I

#### 3.3.1 Animales

Se emplearon 32 ratas macho de la cepa Wistar (*Charles River Laboratories*, Lyon, Francia) pesando entre 300 y 330 g, alojadas en ciclo de luz 12h/12 h (encendido a las 8 a.m.) con temperatura controlada a  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa del 60%. Dieta ad libitum (A04, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France). Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo a la directiva sobre Bienestar Animal (2010/6 EU) y fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Nacional de Educación a Distancia. Después de siete días de aclimatación los animales fueron individualizados y asignados aleatoriamente a uno de los siguientes cuatro grupos experimentales. i) Coc: cocaína (15 mg/kg p.v./sesión), ii) Alc: alcohol (2 g/kg p.v./sesión), iii) C+A: cocaína+alcohol 15 mg/kg p.v. sesión + 2 g/kg p.v./sesión) o iv) Sal: Control salino (NaCl 0,9%).

#### 3.3.2. Implantación del catéter

Para la administración intravenosa de las drogas se implantó un catéter de policloruro de vinilo (1 mm de diámetro externo y 0,5 mm de diámetro interno) con un extremo de silicona inserto en la vena yugular derecha, mediante el procedimiento que se describe a continuación.

#### Analgesia y anestesia

Para prevenir el dolor postquirúrgico se aplicó Buprenorfina (0.05 mg/kg p.v., SC). A continuación, se colocó el animal en una cámara de preanestesia cerrada con oxígeno e Isoflurano al 5% y para el mantenimiento con Isoflurano al 2% (La Bouvet, Francia).

#### Disección de la vena yugular derecha

Una vez comprobado el correcto plano quirúrgico (P1), el animal se colocó en posición supina y, previo afeitado de la zona, se realizó una incisión en la línea media cervical. Se diseccionaron los músculos pretraqueales y esternocleidomastoideos para acceder y aislar una sección de 5 mm del vaso sanguíneo. Usando sutura de seda 4-0, se colocó una ligadura en forma de lazo suelta en los extremos, tanto craneal como caudal del vaso, para maximizar la exposición del mismo. Mediante el uso de tijeras

microquirúrgicas, se hizo una pequeña incisión donde se implantó el catéter de cloruro de polivinilo.

### **Implantación del catéter**

El catéter de cloruro de polivinilo (0.064" d.i) se introdujo en línea con el vaso hacia el corazón con la ayuda de la micro-disección de gancho y fórceps y se avanzó el catéter hasta que el segmento de inserción de 30 mm estuvo dentro el vaso. Las ligaduras en los extremos craneal y caudal se emplearon para asegurar el catéter al vaso. El otro extremo del catéter se desplazó de manera subcutánea hasta salir a través de una incisión en el costado (a la altura de las primeras vértebras torácicas) del animal donde se insertó en un tornillo de nylon (*Plastic One*) unido a una malla quirúrgica con cemento dental. Este tornillo, que sirve de fijación a la conexión exterior, lleva coaxialmente el tubo metálico del catéter que permite su unión al circuito exterior de la bomba de infusión que suministrará los tratamientos. Los sitios de incisión se suturaron con sutura de seda 4-0.

### **Comprobación de la funcionalidad de la vía**

Posteriormente, se dejó a los animales un tiempo de recuperación de siete días. Los cinco primeros días se aplicó una analgesia mediante Meloxicam en el agua de bebida. Un día antes del comienzo del programa de administración se comprobó el correcto estado del catéter implantado mediante la infusión de una solución de tiopental sódico a una mínima dosis (10 mg/kg p.v.). Si el animal mostraba signos inmediatos de pérdida de consciencia o coordinación motora, se consideró que el catéter funcionaba correctamente. Para el mantenimiento de la vía y durante todas las sesiones experimentales se infundió diariamente, a través del catéter, 0,4ml de una solución salina compuesta por heparina (1,5 UI/ml) y gentamicina (40mg/ml) para mantener el catéter limpio, funcional y prevenir posibles infecciones.

### **3.3.3. Preparación de los tratamientos**

Se empleó alcohol etílico, (96%) con calidad excipiente (Emprove® exp, Sigma Aldrich, Germany). La cocaína (hidrocloruro de cocaína) fue proporcionada por la Agencia Española del Medicamento del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Las disoluciones de cada sesión, fueron preparadas diariamente a partir de una concentración madre de cocaína que se renovó cada tres días. Se empleó suero fisiológico (NaCl, 0,9% p/v) como diluyente.

### 3.3.4. Administración pasiva de los tratamientos

La duración del tratamiento fue de 21 días con una sesión diaria de 105 minutos. Se emplearon cámaras de condicionamiento operante (*Coulbourn Instruments*, Allentown, PA, EE. UU.) como lugar adecuado para que las ratas recibieran los tratamientos por vía intravenosa (Figura 14). En estas cámaras está forzada la ventilación y atenuado el ruido. Además, disponen de un sistema de conexión a la vía (catéter) de la rata que facilita la infusión de las disoluciones de los tratamientos mientras la rata mantiene su movilidad.

El sistema de administración consistió en una bomba (*Harvard 22, Harvard Apparatus*, Holliston, MA, EE. UU.) conectada a un interfaz controlado mediante un programa realizado *ad hoc* con el software MED-PC para Windows (*Med Associates Inc.*). Durante los 105 minutos de cada sesión las ratas recibieron de forma pasiva 30 infusiones de 30 segundos a intervalos regulares. Cada tres días se procedió al pesado de las ratas y a recalcular los parámetros de la bomba de infusión para que las posibles variaciones en el peso del animal no afectasen a la dosis/kg p.v. real recibida.

**FIG 14.** Caja de condicionamiento o caja de Skinner (*Coulbourn Instruments*) empleada para la administración de los tratamientos. Sobre el habitáculo que alberga a dicha caja, a la derecha, se observa la bomba que infunde las soluciones con los tratamientos. Desde el dorso de la rata se observa el muelle flexible que protege al tubo de plástico (o catéter externo) que discurre por su interior y a través del cual circula la solución que contiene la droga que es impulsada por la bomba.

### 3.3.5 Extracción de las muestras

El día 21 del tratamiento, 15 minutos después de finalizar la sesión<sup>5</sup>, las ratas se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron 2 ml de sangre de cada sujeto en tubos eppendorf previamente heparinizados y se centrifugaron a  $1500 \times G$ , 4º C, durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y quedó almacenado a -70º C. Previamente a los análisis las proteínas plasmáticas fueron extraídas mediante ultrafiltración utilizando un filtro de 30 kDa (*Centrifree, Merck Millipore, Irlanda*).

### 3.3.6. Determinación de alcohol en plasma

Los niveles de alcohol etílico en plasma fueron cuantificados mediante la enzima alcohol oxidasa (*Ethanol Assay Kit, Biovision Inc, CA, USA*). La incubación tuvo una duración de 60 minutos a temperatura ambiente. Se preparó un “set” de patrones en condiciones similares a las de las muestras de plasma. La lectura fue realizada a 570 nm mediante un espectrofotómetro Biowave WPA, (*Biochrom UK*). Todas las medidas fueron tomadas por duplicado.

### 3.3.7. Cuantificación L-Phe y L-Tyr (EC/MS)

Todos los reactivos empleados contaban con calidad cromatográfica. Metil- $\beta$ -CD (grado de sustitución 1.7-1.9), y 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD (g 4.2) fueron adquiridos a Fluka (Buchs, Suiza). Ácido fórmico, trigolina, L-aspartato, L-glutamato, D-glutamato, taurina, glicina, L-alanina, L-serina, L-arginina, sodium dodecilsulfato sódico, hydroxypropyl- $\beta$ -CD, (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -CD, metanol, ácido tetrabórico fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

La metodología empleada, electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE/MS), fue previamente optimizada a fin de conseguir la separación quiral de L-Tyr y L-Phe (Sánchez-López, *et al.*, 2016). La ionización de los analitos se efectuó mediante electrospray (ESI). El montaje CE-ESI-MS consistió en un HP – <sup>3D</sup>CE de *Agilent*

---

<sup>5</sup> Para establecer la duración de cada sesión y el periodo desde su finalización hasta la extracción de la muestra de plasma, se realizó una revisión bibliográfica sobre la exposición conjunta a cocaína y alcohol desde el punto de vista de la toxicocinética del cocaetileno. Herbst *et al.*, (2011) estudiaron diferentes rutas de administración de cocaína combinada con alcohol, a la vez que estudiaron la toxicocinética del cocaetileno generado por dicha combinación y, observaron que por vía intravenosa a los 120 minutos, aproximadamente, se alcanza la máxima concentración de cocaetileno. Con arreglo a lo expuesto, se fijó una duración de 105 minutos para cada sesión y un periodo de tiempo de 15 minutos desde su finalización hasta la extracción de sangre troncal.

*Technologies* (Palo Alto, CA, USA) acoplado a través de un modelo de interfaz de cubierta coaxial ortogonal G1607A de *Agilent Technologies* (Palo Alto, CA, EE. UU) a la fuente ESI del Espectrómetro de masas con un analizador tipo Ion Tramp (trampa de iones) modelo AmaZon SL (*Bruker Daltonics*, Bremen, Alemania).

Se empleó ácido fórmico 2 M (pH 1,2) como electrolito de separación. La separación se realizó en un capilar de sílice fundida sin recubrimiento de 120 cm y 50  $\mu\text{m}$  de I.D, aplicando 30 kV (polaridad positiva) a 15°C. La inyección de la muestra se realizó mediante la aplicación de 50 mbar durante 250 s. Como factores de separación se emplearon dos ciclodextrinas: 180 mM de metil- $\beta$ -CD y 40 mM de 2-hidroxipropil- $\beta$ -CD.

Los parámetros operativos de MS fueron: un líquido de envoltura consistente en methanol / agua 50:50 (v / v) con 0.1% (v / v) de ácido fórmico bombeado a un caudal de 3.3  $\mu\text{L}$  / min por medio de una bomba de jeringa (*Hamilton*, USA). Las condiciones del nebulizador y del gas de secado fueron: 3 psi N<sub>2</sub> y 5 L / min N<sub>2</sub> a 200 °C, respectivamente. La fuente de ESI operó en modo positivo a -4,5 kV con un voltaje de placa terminal de -500 V. Los experimentos con MS<sup>2</sup> se realizaron fragmentando el ión precursor de los compuestos estudiados: m/z 165,9 para L-Phe, m/z 181.9 para L-tyr y m/z 138.0 para el estándar interno (trigonelina). Para el control de MS y el análisis de datos, se utilizó el software Trap-Control 7.0 para *AmaZon*.

### 3.3.8. Electroforesis capilar-LIF

Los niveles plasmáticos de siete aminoácidos, L-aspartato, L-glutamato, taurina, glicina, L-alanina, L-serina y L-arginina, se cuantificaron mediante electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (EC-LIF), usando una variante de la electroforesis capilar, denominada cromatografía electrocinética micelar (MECK), que es muy eficiente en las separaciones quirales (Li *et al.*, 2010). El instrumento de electroforesis capilar utilizado fue un equipo Beckman PA 800 plus (*Beckman coulter*, CA, EEUU). La solución tampón de carrera consistió en un 15 mM (pH 10.2) que contenía SDS 70 mM, 5% (v/v) de metanol, 17,5 mM de 2-hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina y 5 mM heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -Ciclodextrina. Se aplicó un voltaje de 23.5 KV a un capilar de sílice fundida sin revestimiento interno (Beckman Coulter) de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y una longitud total de 60,2 cm (50 cm al detector) a 25°C. Entre los análisis, el capilar se acondicionó con HCl 0,1 M durante 2 min, agua desionizada 1 min, NaOH 0,1 M 2 min, agua desionizada 1 min y la solución tampón de carrera 2 min. Las muestras y los estándares se diluyeron en una proporción de 1:20 (v / v) con tampón borato 5 mM

(pH 9.6) y luego se inyectaron hidrodinámicamente en el capilar durante 5 s aplicando una presión de 0.5 psi. La detección se realizó utilizando un detector de módulo láser con un láser de iones de argón a 488 nm (Beckman-Fullerton CA, EE. UU.). El área corregida de cada pico se midió utilizando el software Karat 32 (Beckman-Fullerton CA, EE. UU.). Todos los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron superiores 0.99. Se empleó D-glutámico como estándar interno.

### 3.3.9. Análisis estadístico

La concentración de alcohol en plasma, expresada en mg/dl, entre los dos grupos que recibieron tratamiento que contenía alcohol etílico (Alc vs C+A) se comparó mediante una prueba *t* de Student para muestras no relacionadas. Los datos del análisis cuantitativo de los aminoácidos, expresados en  $\mu\text{Ml/L}$ , y las cinco ratios estudiadas se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA factorial de dos vías (Alcohol X Cocaína). Considerando la presencia de cada droga en el tratamiento como un factor con dos niveles (alcohol, control) y (cocaína, control). Previamente se realizó un análisis exploratorio de datos (EDA) mediante el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Cuando alguno de los grupos de datos no superó el test de normalidad para una de las variables se procedió a transformar los datos hasta cumplir con los requisitos de normalidad. Mediante la prueba de Levene se confirmó que la homocedasticidad, homogeneidad de varianza, en todos los casos se superaba los criterios requeridos para el ANOVA. Cuando la interacción entre factores fue significativa, se estudió por comparaciones por pares mediante el empleo de sintaxis con ajuste de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS V.21 y se estableció  $\alpha < 0.05$  para todos los análisis.

### 3.4. Desarrollo del Estudio II

#### 3.4.1. Animales y procedimientos generales

Se emplearon 91 ratas de la cepa Wistar (45 machos y 46 hembras) criadas en el Bioterio de la Facultad de Psicología de la UNED con progenitores adquiridos a *Charles River Laboratories* (Lyon, Francia). Los cruces se realizaron siempre entre los mismos machos y hembras. Las condiciones de alojamiento y cuidados son las ya descritas para las ratas empleadas en el Estudio I. Los destetes se realizaron a los 21 días, procediendo en ese momento a la separación de las proles en grupos monosexuales. Cada camada se dividió aleatoriamente en dos mitades empleando la primera mitad para los grupos de adultos jóvenes (48 días al comienzo de administración de drogas) y la otra mitad para sujetos adultos (95 días al comienzo de la administración de drogas). Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a cada tratamiento y en cada sesión se incluyeron igual número de hembras como de machos. Se procedió de la misma forma para el balanceado intra-sesión de los tratamientos, de tal manera que hubiera un número similar de ratas asignada a cada tratamiento.

- Grupo Alcohol (2g/Kg p.v.)
- Grupo Cocaína (15 mg/Kg p.v.)
- Grupo Alcohol+Cocaína (2g/Kg p.v.+ 15 mg/Kg p.v.)
- Grupo control salino

Los tratamientos se administraron por vía intravenosa durante 21 días con el mismo procedimiento instrumental ya indicado para el Estudio I.

#### Implantación del catéter

La implantación del catéter se realizó de acuerdo a lo descrito en el Estudio I.

#### Administración pasiva de las drogas

El procedimiento de administración pasiva de drogas se efectuó de igual forma que en el Estudio I.



### 3.4.2. Obtención de las muestras: plasma, órganos y estructuras encefálicas

El día 21 del tratamiento, 15 minutos después de finalizar la sesión, las ratas se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron los encéfalos y 2 ml de sangre de cada sujeto en tubos eppendorf previamente heparinizados que se centrifugaron a  $1500 \times G$ ,  $10^{\circ} C$ , durante 12 minutos. El sobrenadante se recogió y quedó almacenado a  $-70^{\circ} C$ . Las proteínas plasmáticas fueron extraídas mediante ultrafiltración, utilizando un filtro de 30 kDa (*Centrifree, Merck Millipore, Irlanda*).

### 3.4.3. Obtención del perfil de metabolitos de la cocaína

Los metabolitos presentes en plasma procedentes de la metabolización de la cocaína o de la cocaína junto con alcohol fueron analizados mediante cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (Sánchez-López, *et al.*, 2017). Se empleó un cromatógrafo serie 1100 (Agilent Technologies, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (QTOF) cuadrupolo serie 6530 (Agilent Technologies, Alemania) con un electrospray ortogonal Jet Stream como fuente de ionización (ESI).

La columna consistió en un C18 Ascentis Express (Sigma, St. Louis, EE. UU.), Con  $100 \times 2,1$  mm de diámetro interno (partículas de núcleo fundido con una capa porosa de 0,5  $\mu m$  de espesor y un tamaño de partícula total de  $2,7 \mu m$ ). La columna se mantuvo a  $40^{\circ} C$  durante la secuencia analítica. El sistema funcionó con un volumen inyectado de  $10 \mu l$  y un caudal de  $0,4$  ml/min. Las fases móviles fueron agua (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B), ambas con ácido fórmico al 0,1%. El gradiente lineal se ajustó del 5% de B al 100% de B en 30 minutos, volviendo a las condiciones iniciales en 1 minuto, manteniendo el reequilibrio al 5% de B durante 15 minutos.

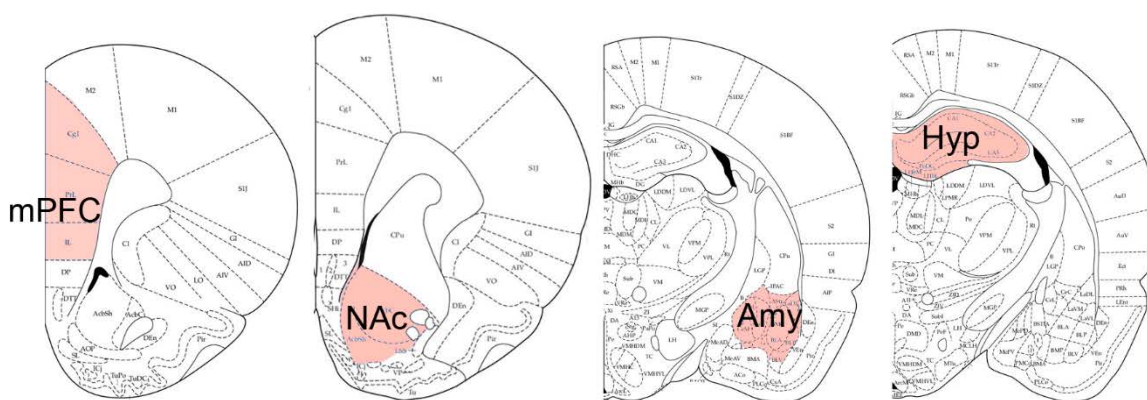
Las condiciones de la fuente de ionización fueron las siguientes: voltaje capilar de 3000 V, con un voltaje de boquilla de 0 V; presión del nebulizador a 35 psi; gas de la envoltura de la corriente en chorro de  $6,5$  l / min a  $275^{\circ} C$ ; y secado de gas de  $10$  L / min a  $275^{\circ} C$ . El análisis de MS se realizó en modo ESI positivo con rango de masa establecido en  $m/z$  70–1600 (rango dinámico extendido) en modo de resolución de escaneo completo a una tasa de escaneo de 2 escaneos por segundo. Los análisis de MS/MS se llevaron a cabo seleccionando el ión precursor en el tiempo de retención correspondiente, con una energía de colisión de 20 V utilizando nitrógeno como gas de colisión 175V.

### 3.4.4. Determinación de proteínas y expresión génica

#### 3.4.4.1. Procesamiento de las muestras

##### Disección de las regiones cerebrales

Los encéfalos, procedentes de una cámara frigorífica a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se colocaron sobre una cama de hielo picado durante una hora. Se separaron ambos hemisferios y se seleccionó el hemisferio izquierdo, que se colocó en el micrótopo de congelación sobre una cama de sacarosa al 30%. Se realizaron cortes seriados de  $300\text{ }\mu\text{m}$  de espesor, lo que permitió la recolección del tejido de interés de acuerdo con el atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 2013) en tubos eppendorf estériles con ayuda de lancetas. De cada hemisferio se extrajeron las regiones: CPFm, hipocampo, NAc y amígdala (Figura 15), que se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior homogenización y aislamiento.



**Figura 15.** Secciones coronales representativas mostrando las regiones cerebrales (en rosa) seleccionadas para el estudio. mCPF: Corteza Prefrontal medial; NAc: Núcleo Accumbens; Amy: Amígdala; Hyp: Hipocampo. Modificado de Paxinos y Watson 2013.

##### Homogenización de tejido y aislamiento de ARN

Las muestras fueron homogeneizadas con micropistilos en  $500\text{ }\mu\text{L}$  de Triazol y se incubaron  $5\text{ min}$  a temperatura ambiente (RT) para separar nucleoproteínas. Seguidamente se añadieron  $100\text{ }\mu\text{L}$  de cloroformo en cada tubo y se volvieron a

incubar 5 min a RT. Se centrifugaron a 12000 xG durante 15 min a 4°C, obteniéndose tres fases por decantación. Se tomó la fase acuosa superior, correspondiente al ARN y se llevó a tubos nuevos para realizar la precipitación del ARN. Se añadieron 250 µL de isopropanol y seguidamente fueron incubadas 10 min a RT y centrifugadas a 12000 xG durante 10 min a 4°C, tras lo que se obtuvo pellet en el fondo del tubo. Se procedió a su lavado con micropipeta y se añadieron 500 µL de etanol 75%. Se centrifugaron a 7500 xG durante 5 min a 4°C y se retiró el sobrenadante. Tras ello, se introdujeron los tubos en la centrífuga de vacío durante 10 min a 45°C, en programa V-AQ para secar el pellet y se resuspendió en 50 µL de agua/DEPC. El contenido se trasvasó a tubos pequeños y se midió el rendimiento y pureza en Nanodrop mediante espectometría por absorbancia 280/260 (1 µL por muestra, por duplicado), con una concentración mínima esperada de 50 ng/µL = 0,05 µg/µL. Las muestras se almacenaron a -80°C.

### **Homogenización del tejido y aislamiento de la proteína**

Las muestras fueron pesadas y homogenizadas con micropistilos en tampón RIPA (50mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.1% Triton; 0.5% Deoxicolato sódico; 0.1% SDS; inhibidores de proteasas). Después de 2 horas en agitación a 4°C, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el pellet y se cuantificó la proteína disponible.

### **Cuantificación proteica**

Las proteínas fueron cuantificadas en placas de 96 pocillos usando el método colorimétrico BCA-1 Bicinchoninic Acid Kit for Protein (Sigma). Brevemente, se añadieron 175 µL de reactivo de trabajo a 25 µL de muestras. En paralelo se realizó una recta de calibrado con BSA en un rango de concentraciones de 0 a 1000 µg/mL. Se midió la absorbancia a 562 nm en BioRad iMart Microplate reader.

### **Electroforesis y Western Blot**

Se cargaron 5 µg de proteína de cada muestra en geles de poliacrilamida (12% SDS-PAGE) para realizar la separación proteica en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, para la transferencia a nitrocelulosa, se usó el sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) a 2.5 A, 25 V durante 12 minutos. Una vez realizada la transferencia, se tiñó la nitrocelulosa con Rojo Ponceau (Sigma P7170) durante 5 minutos en agitación y se retiró el exceso con ácido acético 1%. Se fotografió en visible para cuantificar la proteína total. Después, se bloqueó la membrana con leche en polvo desnatada al 5% en PBS/tween20 (0.1% Tween) durante al menos 1 hora. Se lavó con

tampón PBS durante 5 minutos y se incubaron las membranas, O/N 4°C, con anticuerpo primario: Anti-PSD95 (ratón, Sigma MABN68) a una concentración 1:2000 o Anti-Gefirina (conejo Sigma AB5725) a una concentración 1:2000. Se incubó con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa durante 1 hora R/T (anti-ratón 1:10000; anti-conejo 1:10000). Siempre, entre cada paso, se hicieron 3 lavados de 5 minutos en PBST. Finalmente, se reveló con *Clarity Western ECL Substrate*: 1:1. Las imágenes fueron tomadas con un documentador de imágenes (SynGene) y se densitometró normalizando los datos obtenidos para la expresión de cada proteína con el valor medio de cada membrana y luego con las imágenes tomadas del visible de cantidad total de proteína, relativizándose ese valor con respecto a un control de cada membrana (salino). Se calculó una ratio PSD95/Gefirina.

### Síntesis de cDNA

Para la realización de la PCR, el mRNA aislado fue tratado y retrotranscrito con el Kit RevertAid RT Reverse Transcription (K1691), siguiendo las recomendaciones del fabricante y, finalmente, diluido en agua para disminuir el impacto de los inhibidores de PCR. El cDNA obtenido se almacenó a -80°C.

### Análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real

Hasta un total de 15 genes diferentes (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Gria1*, *Gria2*, *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabrg2*, *Gabrd*, *Faah*, *Napepld*, *Dagla*, *Mgll*, *Cnr1* y *Actb*) fueron analizados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) tras su amplificación empleando SYBR-green como fluoróforo, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El análisis cuantitativo de qPCR en tiempo real se realizó con un sistema de detección de secuencia rápida de Applied Biosystems utilizando la mezcla de PCR universal SsoAdvanced™ universal SYBR Green Supermix (2X) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (BioRad). En cada pocillo se añadió la mezcla de Master mix, los cebadores (0,5 µM cada uno) y agua/DEPC hasta completar volumen, junto con la muestra de cDNA. El volumen total de la reacción fue de 10 µL.

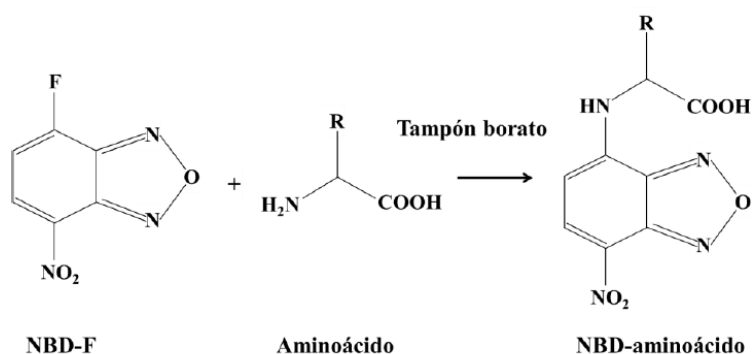
Las condiciones del termociclador QuantStudio 5 Real-Time PCR System fueron las siguientes: mantener durante 30 s a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 5 s, y seguido de 60°C durante 30 s. Los niveles de expresión génica se determinaron utilizando un software 7500 Fast System SDS (Applied Biosystems) de acuerdo con el

método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . De rutina se realizó una curva de “melting” para comprobar la homogeneidad de los fragmentos amplificados.

Se usó el gen ribosómico 18S como control endógeno para normalizar a modo de calibrador. Se empleó el método  $\Delta\Delta Ct$  para calcular, a partir de los datos de Ct que obtuvimos del termociclador, la variación en la expresión génica de nuestros genes de interés mediante la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{((Ct_{gen} - Ct_{18S})_{muestra} - (Ct_{gen} - Ct_{18S})_{referencia/control})}$ .

### 3.4.5. Cuantificación de aminoácidos plasmáticos

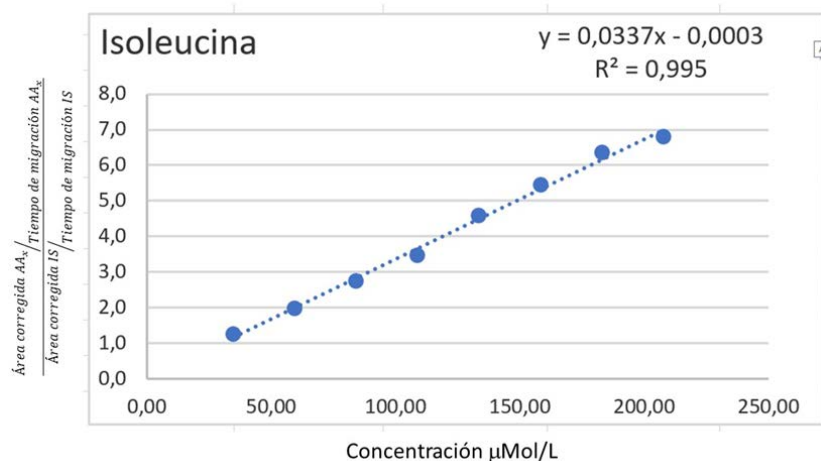
Once aminoácidos se cuantificaron mediante EC-LIF: L-prolina (L-Pro), L-isoleucina (L-Iso), L-leucina (L-Leu), L-ornitina (L-Orn), L-glutamina (L-Gln), L-alanina (L-Ala), L-treonina (L-Tre), glicina (Gly), L-serina (L-Ser), taurina (Tau) y L-glutamato (L-Glu). El método se describe en Lorenzo *et al.*, (2013) y, brevemente, a continuación se detallan los parámetros fundamentales del mismo. Las muestras de plasma fueron filtradas (30 kDa, Centrifree, Millipore) y, junto con seis set de patrones, se derivatizaron con el fluoróforo NBD-F (4-fluoro-7-nitrobenzofurazán) (Figura 16) en tampón borato (concentración 10 mM, pH 10). El equipo de análisis empleado fue un PA 800 Plus (Beckman Coulter Inc.) con detección mediante fluorescencia inducida por láser (LIF). Se empleó un capilar de sílice fundida de 75  $\mu m$  de diámetro interno y 50 cm de longitud efectiva. Las condiciones de separación fueron: Voltaje: 21 KV, Longitud de onda del láser: 488 nm. El tampón de carrera consistió en borato 175 mM, pH 10.25 y 12 mM  $\beta$ -CD.



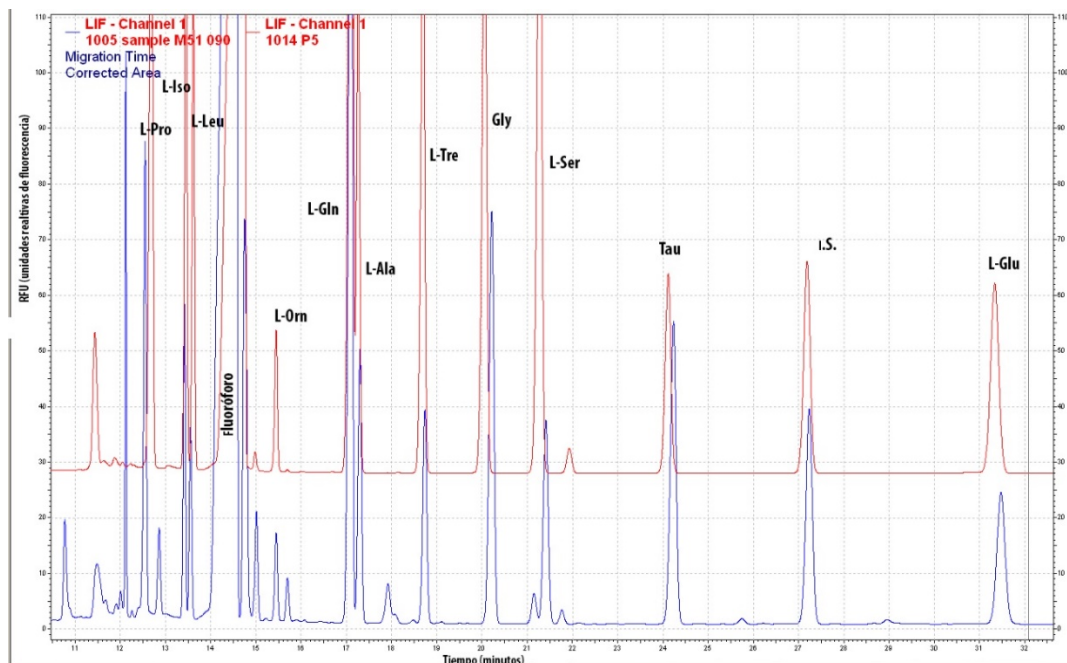
**Figura 16.** Unión aminoácido-fluoróforo NBD-F (4-fluoro-7-nitrobenzofurazán).

La linealidad fue establecida mediante 7 juegos de patrones, conteniendo, tanto muestras como patrones, el estándar interno (I.S.) ácido aminodipídico a 200

$\mu\text{M}$ . Las curvas de calibración fueron elaboradas con el valor de las áreas corregidas y corrigiendo este valor, a su vez, con el tiempo de migración y el I.S. con la siguiente fórmula:  $\text{Área corregida AA} / \text{Tiempo de migración AA} \times \text{Área corregida IS} / \text{Tiempo de migración IS}$  y se consideraron como válidas cuando el coeficiente de determinación  $R^2$  era igual o superior a 0,99 (Figura 17).



**Figura 17.** Recta de calibrado para L-Iso obtenida mediante electrofresis capilar. Concentraciones de los patrones (eje de abscisas). Señal corregida:  $\text{Área corregida AA} \times \text{Tiempo de migración AA} / \text{Área corregida IS} \times \text{Tiempo de migración IS}$  en el eje de ordenadas.



**Figura 18.** Electroferogramas superpuestos. El color Azul indica el de una muestra real, mientras que el color Rojo de la muestra de once aminoácidos correspondiente al patrón N°5.

El área del pico correspondiente a cada aminoácido se obtuvo mediante el software 32 Karat (*Beckman Coulter*, Fullerton, CA, USA). Para obtener una mejor reproducibilidad se utilizó el “área corregida”, que es una normalización de la geometría del pico que compensa posibles solapamientos parciales con otros picos o interferencias (Figura 18). Utilizando los sets de patrones, indicados anteriormente, que incluían todos los AA a cuantificar se construyó una recta de calibrado mediante una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando la hoja de cálculo Excel. En el eje de abscisas se asignó el valor de la concentración de cada aminoácido en micromoles/litro y en el de ordenadas la señal medida con las correspondientes correcciones, por tiempo de migración y por el estándar interno, anteriormente indicadas.

### **3.4.6. Análisis estadístico**

#### **3.4.6.1. Proteína y expresión génica de subtipos de receptores**

Con cada variable, proteína o gen, un análisis ANOVA de dos vías (Sexo x Tratamiento) fue realizado para estudiar el posible efecto de los cuatro tratamientos o del sexo sobre dicha variable o bien una posible interacción sexo-tratamiento. Se realizó el correspondiente *post hoc* por la diferencia mínima significativa (DMS), basado en la distribución t de Student. Cuando la interacción entre factores fue significativa se estudió por comparaciones por pares con ajuste de Bonferroni mediante el empleo de sintaxis. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS V.21 y se estableció  $\alpha < 0,05$  para todos los análisis. En dos casos la N de machos y/o hembras no llegó a cuatro y no se estudió la interacción sexo x tratamiento.

#### **3.4.6.2. Análisis factorial exploratorio (AFE) de los niveles de aminoácidos plasmáticos**

En un intento de reducir la dimensionalidad del conjunto de datos se llevó a cabo un análisis mediante una técnica alternativa a la de componentes principales, que utiliza el método de extracción de factores denominado mínimos cuadrados no ponderados (ULS)<sup>6</sup>. Esta metodología, por no requerir de normalidad multivariada, resultó ser la más adecuada para nuestro tipo de muestra.

---

<sup>6</sup> El análisis de componentes principales (PCA) no es una técnica de análisis factorial exploratorio adecuada, a pesar de estar muy extendida como método de extracción de



### Extracción de factores

Se llevó a cabo un análisis mediante una extracción de mínimos cuadrados no ponderados (ULS) por no requerir de normalidad multivariada y ser muy robusto por lo que es más adecuado para muestras pequeñas. El objetivo fue buscar los parámetros que minimizaran los residuos, es decir, la suma de cuadrados de las diferencias entre las correlaciones observadas y la matriz de correlaciones predicha (Abad et al., 2011). El método se desarrolla en varias etapas: elección del número de factores, rotación de factores y estimación de las puntuaciones factoriales.

### Análisis de Varianza (ANOVA)

Las puntuaciones factoriales calculadas por el método anteriormente descrito, se introdujeron como variables dependientes en sucesivos ANOVAs mediante un diseño factorial univariado de efectos fijos completamente aleatorizados con tres factores, sexo, edad (joven y adulto) y tratamiento, teniendo este último cuatro niveles que correspondían a los grupos salino, alcohol, cocaína y alcohol + cocaína.

#### 3.4.6.3. ANOVA factorial de los aminoácidos plasmáticos

Se realizó un análisis factorial de varianza, modelo lineal general, 2x2x2x2 (cocaína x alcohol x edad x sexo). Los niveles para estos cuatro factores fueron: cocaína, sí / no; alcohol, sí / no; sexo, hembra/macho; y edad, adulto joven (48 días) / adulto (95 días). Previamente se realizó un análisis exploratorio de datos mediante el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Cuando alguno de los grupos de datos no superó el test de normalidad para una de las variables, se procedió a transformar los datos hasta cumplir con los requisitos de normalidad. Mediante la prueba de *Levene* se confirmó el cumplimiento de homocedasticidad requerida para el ANOVA. Cuando la interacción entre factores fue significativa, se estudió mediante comparación por pares utilizando el ajuste de Bonferroni y el empleo de sintaxis. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS V.21 y se estableció un nivel de significación  $\alpha < 0,05$ .

---

factores. PCA no diferencia entre factores comunes y factores únicos y su objetivo es determinar la combinación lineal de las variables medidas. (Abad et al., 2011).



### 3.5. Desarrollo del Estudio III

#### 3.5.1. Animales

Se emplearon ratas Wistar macho y hembra criadas en el Bioterio de la Facultad de Psicología de la UNED (progenitores procedentes de Charles River Laboratories, Lyon, Francia). Las crías se destetaron a los 21 días de edad y se alojaron en grupos monosexuales con un ciclo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad (luz encendida a las 8.00 am) con alimento *ad libitum* (A04, *Scientific Animal Food*, Augy, Francia). Los procedimientos habían sido aprobados previamente por el Comité de Bioética de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (Madrid, España) y se realizaron de acuerdo con la directiva de bienestar animal (Directiva 2010/63 / UE).

#### Implantación del catéter

La implantación del catéter se realizó según lo descrito en el Estudio I.

#### 3.5.2. Autoadministración intravenosa de drogas

Las sesiones de autoadministración (120min) bajo un programa RF-1 comenzaron a la edad de 52+/-1 días, según el esquema de la Figura 13 en cámaras de condicionamiento operante (*Coulbourn Instruments*, Allentown, PA, USA), similares a las empleadas en los Estudios I y II. Cada tres días se recalcularon los parámetros de la bomba de infusión en función del peso de cada animal para mantener la dosis adecuada (*Harvard Apparatus*, Holliston, MA, USA). Mediante un programa ad-hoc (Med-pc software) se controlaron los efectos de dos palancas; activa (infusión del tratamiento correspondiente) e inactiva (ningún efecto). Para indicar la disponibilidad del refuerzo, una luz permanecía encendida sobre la palanca activa, permaneciendo apagada 20 segundos (Time-off) después de cada respuesta válida o cuando se había completado ya el número máximo de 15 infusiones.

### 3.5.3. Automoldeado de la conducta operante de la presión de palanca

Previo a la cirugía, se entrenó a las ratas en un programa de automoldeamiento con bolitas de comida ("pellets", Cibertec S.L.) en la misma caja de condicionamiento operante (Cajas de Skinner) que luego se emplearían para el estudio de la conducta de autoadministración de los tratamientos. Antes de la cirugía las ratas completaron 3 sesiones, en las que obtenían un "pellet" por cada pulsación de la palanca 1 (RF-1), mientras que la presión de la palanca alternativa no producía ningún efecto. Tras la cirugía, las ratas completaron otras tres sesiones en las mismas condiciones que antes de la cirugía, pero conectadas al dispositivo de administración intravenosa de las drogas (Figura 14), por el que los animales recibieron su tratamiento cuando comenzaron las sesiones reales de autoadministración. Esto permitió que las ratas iniciaran los tratamientos familiarizadas ya con el contexto, con el dispositivo sobre su espalda y con la conducta operante a realizar para conseguir una dosis de droga.

### Criterio de adquisición de la conducta de autoadministración intravenosa de drogas

El criterio de adquisición de la autoadministración empleado se basó en el descrito por Carroll y Lac (1993) y Carroll y Lac, (1997), previa adaptación al diseño experimental de nuestro estudio. Estos autores establecieron como adquisición el obtener una media igual o superior a 20 mg/kg p.v. en sesiones de 6 h de cocaína durante cinco días consecutivos. Como la duración de las sesiones en nuestro estudio ha sido de dos horas, la dosis equivalente fue aproximadamente 6,7 mg-sesión y se redondeó a 7 mg/kg p.v./sesión. Nuestro criterio se estableció en obtener siete o más infusiones (1mg/kg/inyección) durante 5 días consecutivos. Los sujetos que tardaron más de 12 días fueron considerados como censurados para la prueba estadística empleada, la de análisis de supervivencia mediante el método de *Kaplan-Meier*.

### 3.5.4. Perfil de los aminoácidos plasmáticos

Las muestras de plasma se filtraron a 30 kDa (*Centrifree*, Millipore) y, junto con un conjunto de estándares, se derivatizaron con el fluoróforo NBD-F (4-fluoro-7-nitrobenzofurazan) en tampón borato (10 mM, pH 10) y con ácido L-2-aminodipídico como estándar interno (IS) a 200  $\mu$ M. Se empleó un equipo de electroforesis capilar PA 800 Plus (*Beckman Coulter Inc.*) con detección de fluorescencia inducida por láser (ECLIF) como equipo para determinar las concentraciones de aminoácidos. Se usó un capilar de sílice fundida de 75  $\mu$ m de diámetro interno y 50 cm de longitud efectiva.

Las variables de análisis fueron: voltaje 21 kV, longitud de onda del láser 488 nm e inyección de muestra de 10 s a 35 mbar.

Se emplearon dos métodos de EC-LIF para cuantificar el perfil plasmático de aminoácidos presentes en las muestras recogidas tras 48 horas de la última sesión de autoadministración. Un primer método, descrito por Lorenzo *et al.* (2013), para cuantificar los diez aminoácidos: L-isoleucina (L-Iso), L-leucina (L-Leu), L-ornitina (L-Orn), L-glutamina (L-Gln), L-alanina (L-Ala), L-treonina (L-Thr), glicina (Gly), L-serina (L-Ser), taurina (Tau) y L-glutamato (L-Glu), que emplea un tampón de carrera borato 175 mM a pH 10,25 y  $\beta$ -CD 12 mM. Un segundo método, con modificaciones del método descrito por Lorenzo *et al.*, (2013), para la cuantificación de otros cuatro aminoácidos, L-tirosina (L-Tyr), L-fenilalanina (L-Phe), L-valina (L-Val) y L-aspártico (L-Asp), que utilizó un tampón borato 80 mM a pH 10.25, MeOH al 5% y B-CD 4 mM. Para estudiar la optimización de la separación de los picos correspondientes a estos cuatro aminoácidos se modificaron tres variables correspondientes al tampón de carrera: concentración de borato (60, 70, 80, 90 y 100 mM), porcentaje de disolvente orgánico (Metanol: 0, 5, 10, 15 y 20%) y concentración de  $\beta$ -ciclodextrina (2, 3, 4, 5 y 6 mM). La resolución se calculó utilizando la fórmula:  $1.18 (tm_2 - tm_1) / (wh_1 + wh_2)$ ; ( $tm_1$ ,  $tm_2$  = tiempos de migración de los picos de los metabolitos contiguos;  $wh_1$ ,  $wh_2$  = anchos de pico a media altura). La linealidad se estableció utilizando los métodos de calibración estándar externos a partir de seis soluciones estándar, que también contienen el I.S. (200  $\mu$ M). Las curvas de calibración se establecieron considerando las áreas de los picos corregidos (relación entre el área de los picos y el tiempo de migración) tanto el estándar externo como el estándar interno. La linealidad exigida al método fue de un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) igual o superior a 0,99.

### 3.5.5. Análisis estadístico

#### Adquisición de la conducta de autoadministración intravenosa de drogas

Para comparar estadísticamente la tasa de adquisición de machos y hembras, según el criterio de adquisición descrito previamente de cocaína y de cocaína combinada con alcohol, se llevó a cabo un análisis de supervivencia mediante el método de *Kaplan-Meier*. Valores de  $p \leq 0.05$  en el estadístico de *Breslow* (prueba *Wilcoxon* generalizada) indicaron diferencias significativas. En los análisis se incluyeron los primeros 12 días desde que el tratamiento del grupo C+A contiene alcohol (día 4). Se consideraron casos censurados aquellos en los que un animal no había adquirido el criterio de autoadministración durante dicho periodo.

### **Mantenimiento de la conducta de autoadministración intravenosa de drogas**

Para el estudio de la conducta de autoadministración de las drogas, cocaína o la combinación de cocaína y alcohol, respecto a su control con autoadministración de salino, se calculó la media de la tasa de respuestas y de los grupos de tratamiento en cada sesión. La tasa de respuesta es una medida de la velocidad de la conducta, valorada como número de respuestas de presión a la palanca emitidas por las ratas en cada sesión dividida por el tiempo en alcanzar el máximo de 15 respuestas o, de no alcanzarse éste, por la duración de la sesión (120 min).

Se llevó a cabo un ANOVA factorial mixto con un factor intra-sujeto de medidas repetidas (sesión) con 24 niveles, correspondientes a cada sesión de autoadministración, y dos factores entre-grupos, uno de efectos fijos, Tratamiento, con tres niveles (salino/cocaína/cocaína + alcohol), y uno de selección de valores, el Sexo de las ratas.

### **Niveles de aminoácidos y Proporciones (ratios) entre ellos**

Para el análisis de los 14 metabolitos medidos en el plasma sanguíneo de las ratas, así como de los sumatorios (SUM AA, AAA, BCAA) y las ratios de aminoácidos (BCAA/Tyr, Tyr/Phe, Gln/Glu, Ser/Ala y Ser/Gly) con significado biológico, se llevaron a cabo sucesivos ANOVAs de dos vías, con dos factores entre grupos, uno de selección de valores, el sexo de los animales, y el otro factor de efectos fijos, el grupo de tratamiento, con tres niveles: las ratas que se autoadministraron cocaína (COC), la combinación de alcohol y cocaína (C+A) y los sujetos control con solución salina (SAL). Para el análisis post hoc se empleó el test de *Gabriel* (para muestras ligeramente no equilibradas y asumiendo igualdad de varianzas) por adecuarse mejor a muestra matriz de datos.

En los casos donde se encontró un efecto principal significativo en el factor tratamiento, se llevaron a cabo contrastes planificados (ortogonales) mediante el test del *Helmert*, donde se comparó en un primer contraste el grupo salino respecto a los que contenían cocaína (Coc+C+A) y, en un segundo, el efecto de la adición del alcohol a la cocaína, C+A vs Coc.

Un análisis exploratorio de los datos (EDA), mediante criterios estadísticos y gráficos, mostró ligeras desviaciones en la forma de las distribuciones de algunas de las variables estudiadas, que se corrigieron cuando fue preciso mediante la

transformación de los valores. El estadístico de Levene confirmó que en todos los casos se cumplió el criterio de igualdad de varianza de las distribuciones. En todas las pruebas se consideró un nivel de significación de  $p < 0,05$ . Los análisis se realizaron mediante el software estadístico SPSS 25.



## 4. Resultados





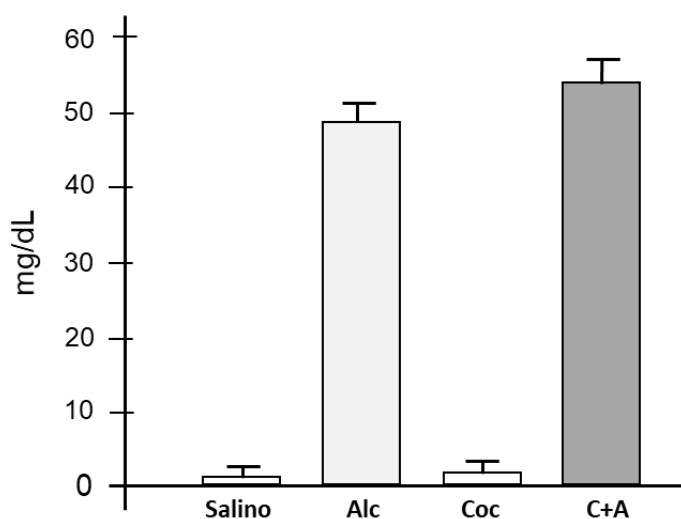


## 4.1. Resultados del Estudio I

En esta primera fase se realizó un estudio preliminar, poniendo a prueba la metodología a emplear en los siguientes estudios. El procedimiento permitió la administración pasiva, crónica y simultánea de cocaína y de alcohol por vía intravenosa, con un modelo que reproducía algunas de las características de los modelos de autoadministración intravenosa de drogas. El modelo se probó en ratas macho adultas de la cepa Wistar con los siguientes grupos experimentales: i) Coc (15mg/kg p.v./sesión), ii) Alc (2gr/kg p.v./sesión), iii) C+A (2gr/kg p.v.+ 15 mg/kg p.v./sesión) y iv) Control-Salino. Finalizadas las veintiuna sesiones programadas se cuantificaron los niveles plasmáticos de nueve aminoácidos. (L-Tyr, L-Phe, Gly, Tau, L-Glu, L-Ala, L-Ser, L-Arg, L-Asp).

### 4.1.1. Niveles de Alcohol en plasma

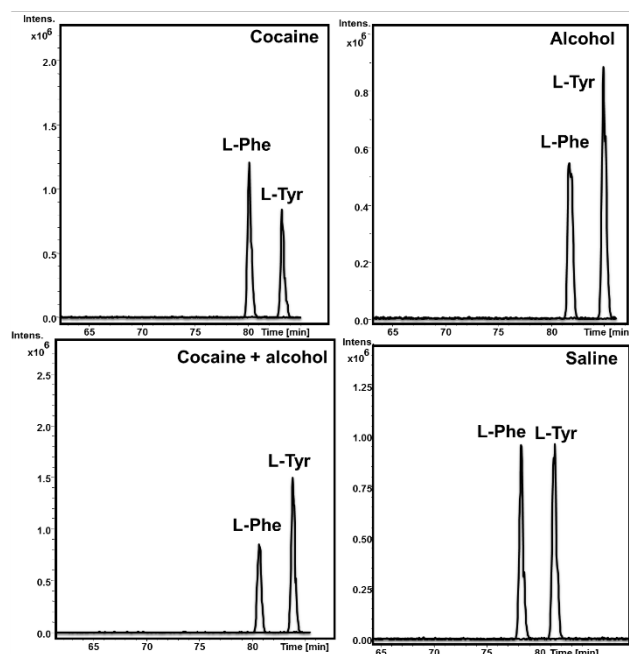
La Figura 19 muestra las concentraciones (mg/dL) de alcohol para los cuatro tratamientos. El grupo de ratas expuestas a alcohol (grupo Alc) ( $M=47,44$ ,  $DE=1,57$ ) mostró una concentración un 12 % inferior a la del grupo de ratas en las que el alcohol estaba combinado con cocaína (grupo C+A) ( $M=53$ ,  $DE=2,63$ ) aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística [ $t(13) = 1,4$ ,  $p=0,12$ ].



**Fig 19.** Niveles *post mortem* de la concentración de alcohol en plasma en mg/dL (media  $\pm$  DE). Las diferencias entre los dos grupos que recibieron alcohol en su tratamiento, Alc vs A+C, no resultaron estadísticamente significativas.

#### 4.1.2. Aminoácidos plasmáticos

En la Tabla IV se muestran las concentraciones plasmáticas obtenidas en  $\mu\text{M/L}$  (media  $\pm$  DE) para los nueve aminoácidos cuantificados. En la Figura 21-a se muestran mediante un diagrama de cajas con bigotes los resultados más relevantes del análisis factorial, con los efectos que la exposición a la cocaína y al alcohol tuvieron sobre las concentraciones plasmáticas de los dos AA donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas, L-Ala y L-Asp. Específicamente, para L-Ala la presencia del alcohol en el tratamiento tuvo un efecto significativo ( $F_{1,27}=4,436$ ,  $p=0,046$ ), con una menor concentración en las ratas que recibieron esta sustancia ( $303,49 \pm 40,9 \mu\text{M/L}$ ) en comparación con las que no incluían esta sustancia en su tratamiento ( $347,1 \pm 62 \mu\text{mol/L}$ ). Además, la presencia del alcohol causó una disminución en los niveles de L-aspartato ( $F_{1,27}=5,022$ ;  $p=0,035$ ). En concreto, los grupos con alcohol (Alc y C+A) mostraron valores más bajos de este aminoácido ( $17,8 \pm 6,5 \mu\text{M/L}$ ) en comparación con de los grupos cuyo tratamiento no contenía alcohol (Coc y Sal) ( $26,3 \pm 11,6 \mu\text{M/L}$ ).



**Figura 20.** Montaje con electroferogramas representativos del efecto de Coc, Alc y C+A sobre las concentraciones de L-Phe y L-Tyr. En los dos superiores se aprecia un efecto opuesto entre la exposición a cocaína y a alcohol.

#### 4.1.3. Ratio L-Tyr/L-phe

La Figura 21-b muestra los efectos que la exposición al alcohol y a la cocaína tuvieron respecto a la ratio L-Tyr/L-Phe. Del análisis estadístico se desprende que la administración de cocaína y la de alcohol, tuvieron efectos de sentido opuesto, estadísticamente significativos. Las ratas que recibieron cocaína, grupos Coc y C+A, mostraron un valor medio de la relación L-Tyr /L-Phe de 0,95. Este valor fue significativamente inferior al promedio de 1,21 alcanzado por los sujetos pertenecientes a los grupos sin esta sustancia ( $F_{1,31} = 14,15$ ,  $p=0,001$ ). Con respecto a si el tratamiento contenía o no alcohol, los sujetos pertenecientes a grupos con alcohol en su tratamiento, Alc y C+A , mostraron un valor promedio de L-Tyr/L-Phe de 1,22, mayor que el valor promedio de 0,94 mostrado por los animales pertenecientes a los grupos sin alcohol, Coc y Sal. Este incremento originado por la presencia del alcohol fue también estadísticamente significativo ( $F_{1,31}=17,53$ ;  $p<0,001$ ).

#### 4.1.4. Ratio L-Glu+L-ASp/Gly+Tau

Respecto a la proporción entre la suma de dos AA que actúan como neurotransmisores excitadores (L-Glu + L-Asp) en relación con otros dos que tienen una función inhibitoria en el SNC (Gly + Tau), se observó que ni la exposición a la cocaína, ni al alcohol afectaron de forma significativa sobre esta ratio, pero sí se apreció una interacción entre ambos tratamientos ( $F_{1,27}=8,30$ ;  $p=0,008$ ). En el estudio de los efectos simples se encontró que, cuando la cocaína no estaba presente, el alcohol mantenía valores significativamente inferiores respecto al salino ( $p=0,004$ ). Siendo el valor promedio del grupo Salino de  $0,32 \pm 0,08$  y para el grupo Alc de  $0,19 \pm 0,09$  (Figura 21-b). Por otro lado, la exposición a la combinación de alcohol y cocaína incrementó el valor de esta ratio respecto a la exposición única al alcohol  $p<0,05$ . Con un valor promedio de 0,188 para el grupo Alc y de 0,273 para el grupo C+A.

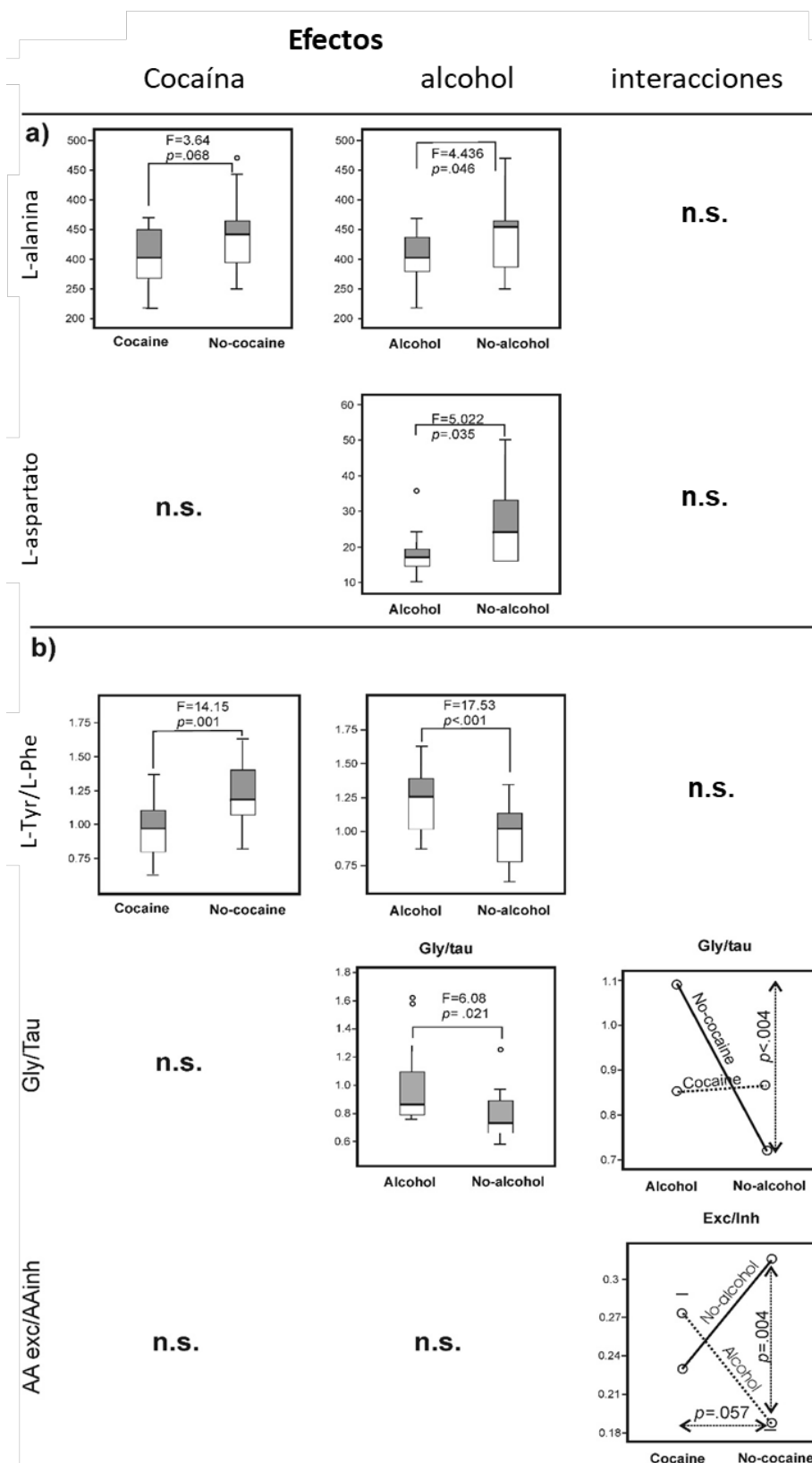
**Tabla IV.** Concentraciones plasmáticas de aminoácidos ( $\mu\text{M L}^{-1} \pm \text{DE}$ ) y valores de ratios  $\pm \text{DE}$ 

	Sal	Coc	Alc	C+A
Aminoácido				
L-Arg	133.5 $\pm$ 53.1	167.1 $\pm$ 85.7	114.9 $\pm$ 16.5	131.6 $\pm$ 30.8
L-Ser	300.5 $\pm$ 103.5	329.9 $\pm$ 67.9	223.7 $\pm$ 65.4	331.1 $\pm$ 40.0
L-Ala*	374.0 $\pm$ 66.0	311.3 $\pm$ 37.1	307.6 $\pm$ 23.9	298.0 $\pm$ 59.1
Gly	221.8 $\pm$ 61.3	220.5 $\pm$ 33.3	268.6 $\pm$ 37.0	227.4 $\pm$ 23.5
Tau	311.1 $\pm$ 77.9	265.9 $\pm$ 62.5	263.2 $\pm$ 67.3	271.3 $\pm$ 44.9
L-Asp*	26.5 $\pm$ 11.2	26.0 $\pm$ 13.2	17.5 $\pm$ 8.4	18.1 $\pm$ 3.4
L-Glu	122.0 $\pm$ 59.4	87.5 $\pm$ 27.9	79.1 $\pm$ 37.9	119.3 $\pm$ 37.8
L-Tyr	70.7 $\pm$ 29.1	57.6 $\pm$ 26.5	70.5 $\pm$ 18.4	61.4 $\pm$ 14.6
L-Phe	64.2 $\pm$ 27.7	76.5 $\pm$ 30.6	54.6 $\pm$ 11.5	54.7 $\pm$ 12.1
Ratios				
L-Tyr/L-Phe*	1.11 $\pm$ 0.16	0.76 $\pm$ 0.13	1.30 $\pm$ 0.24	1.14 $\pm$ 0.20
L-Ser/Gly	1.41 $\pm$ 0.54	1.50 $\pm$ 0.28	0.85 $\pm$ 0.30	1.46 $\pm$ 0.14
AAexc/AAinh*	0.32 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.06	1.88 $\pm$ 0.09	0.27 $\pm$ 0.53
L-glu/Tau	0.41 $\pm$ 0.18	0.33 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.16	0.44 $\pm$ 0.10
Gly/Tau*	0.72 $\pm$ 0.12	0.86 $\pm$ 0.21	1.09 $\pm$ 0.32	0.85 $\pm$ 0.12

L-Asp, L-aspartato; L-Glu, L-glutamato; L-Tyr, L-tirosine; L-Phe, L-phenilalanina; AAexc/AAinh, (L-glu+L-asg) / (Tau+Gly). DE= desviación estándar. \*  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.5. Ratio Gly/Tau

La presencia del alcohol en los tratamientos tuvo un efecto principal significativo sobre la ratio Gly/Tau ( $F_{1,28}=6,08$ ;  $p=0,021$ ), encontrándose también una interacción entre la cocaína y el alcohol ( $F_{1,28}= 5,37$ ,  $p=0,029$ ). Después del estudio de los efectos simples se comprobó que, en ausencia de cocaína, la exposición al alcohol fue significativamente más elevada ( $1,09 \pm 0,32$ ) en su comparación con el grupo de solución salina ( $0,72 \pm 0,12$ )  $p=0,004$ .



**Figura 21.** En la parte izquierda de los paneles a) y b): gráficos de cajas con bigotes para los aminoácidos y ratios que se han mostrado diferenciados por la presencia de cocaína y/o de alcohol, mientras que la parte derecha se muestra gráficamente el sentido de las interacciones significativas encontradas. Caja: percentil 25-mediana-percentil 75; Bigotes: máximo y mínimo valor o 1,5 veces el rango intercuartílico. Puntos: *outliers*.

## 4.2. Resultados del Estudio II

En el Estudio II, empleando la metodología, dosis y tratamientos del Estudio I, se evaluaron distintas variables biológicas en ratas Wistar, machos y hembras, en dos etapas de su desarrollo, jóvenes-adultos (48 días al inicio de los tratamientos) y adultos (95 días al inicio de los tratamientos).

Una vez finalizadas las veintiuna sesiones de administración, se extrajeron muestras de plasma, encéfalos, así como de otros órganos para determinaciones no incluidas en la presente memoria. Sobre las muestras de plasma se cuantificaron mediante EC-LIF once aminoácidos, cuyos resultados se describen en el punto 4.2.4. También sobre estas muestras de plasma se realizó un estudio de tipo metabólico con LC-MS que queda fuera del alcance de esta memoria, pero de cuyos resultados analíticos se han incluido los datos correspondientes a metabolitos del proceso metabólico de la cocaína y de los generados cuando esta concurre con el alcohol (4.2.3).

Respecto a los encéfalos, se puso la atención en cuatro estructuras anatómicas del sistema mesocorticolímbico: CPFm, NAc, Hipocampo y amígdala. En estas cuatro estructuras se determinó la expresión de ARNm de diversas subunidades de receptores de GABA, NMDA y AMPA. En el sistema cannabinoide, además, se incluyó la expresión de enzimas relacionadas con la biosíntesis y degradación de neurotransmisores endocannabinoides. Por otro lado, se cuantificaron dos proteínas relacionadas con las sinapsis, PSD-95 y gefirina. Para cada variable, proteína o gen, se realizó un análisis ANOVA de dos vías (Sexo x Tratamiento) con el objetivo de estudiar el efecto de los tratamientos o el sexo sobre dicha variable y las posibles interacciones sexo-tratamiento. En el momento de la redacción de esta Memoria solamente se dispone de los datos del grupo de ratas jóvenes, que iniciaron su exposición a los tratamientos con 48 días, por lo que no es posible comprobar el efecto que pudiera tener la edad sobre la expresión génica de estos receptores.

### 4.2.1. Proteínas sinápticas: gefirina y PSD-95

Los valores relativos de las proteínas de anclaje de receptores, gefirina y PSD-95, se encuentran representados gráficamente en la Figura 22 y los resultados más relevantes del análisis ANOVA se describen en la Tabla V.

#### 4.2.1.1. Gefirina

Los niveles de gefirina se mostraron alterados en hipocampo y NAc por efecto de los tratamientos. Tras el análisis *post hoc* se comprobó que en el hipocampo las ratas expuestas a alcohol, grupos Alc y A+C, mostraban niveles más bajos de gefirina en su comparación con el grupo salino. En NAc se observó que el grupo Alc mantenía valores significativamente más bajos que los grupos salino y Coc. El análisis estadístico no detectó diferencias por sexo ni interacciones entre los factores tratamiento y sexo.

#### 4.2.1.2. PSD-95

En ninguna de las cuatro regiones se encontró que los tratamientos tuvieran un efecto sobre los valores de PSD-95. Tampoco se detectó un efecto por el factor sexo, ni interacción sexo-tratamiento.

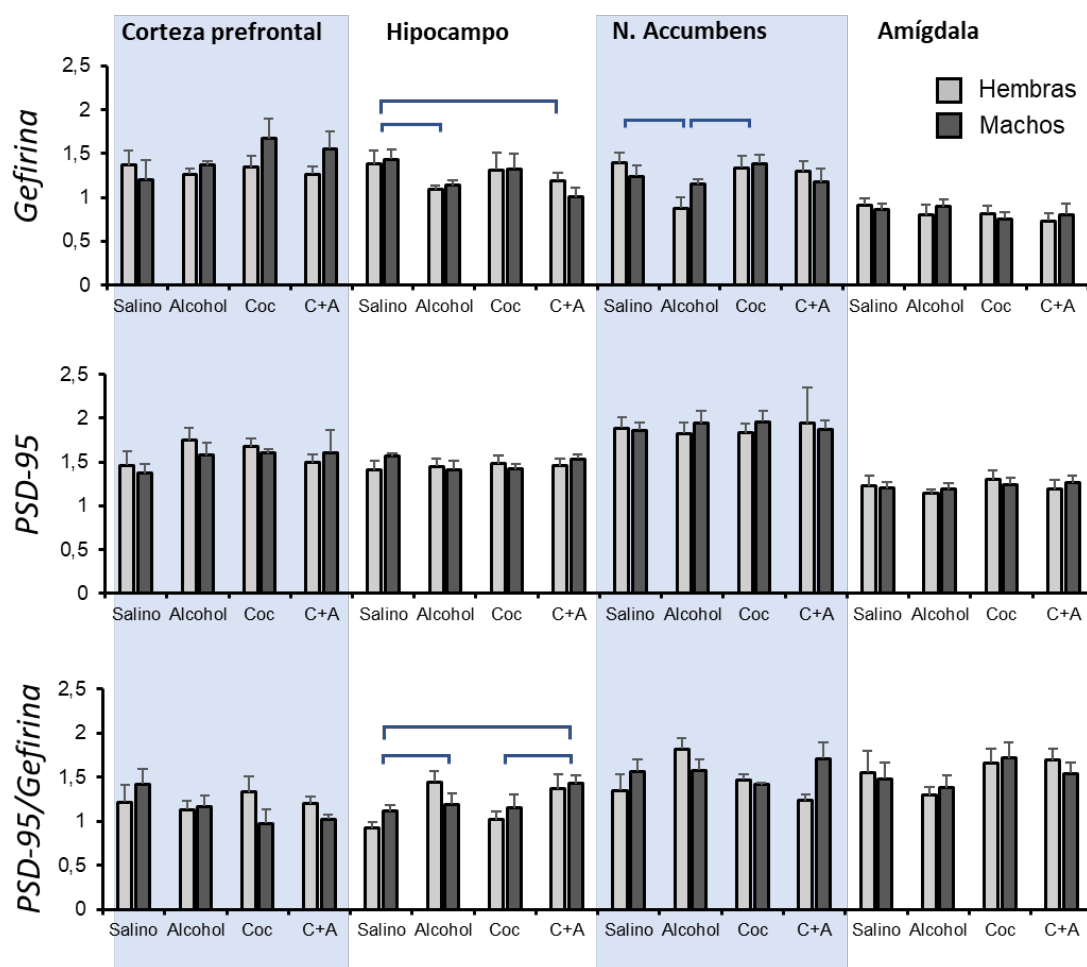
#### 4.2.1.3. PSD-95/Gefirina

Los tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre los valores de la ratio PSD-95/gefirina en el hipocampo. El análisis *post hoc* desveló que los grupos cuyo tratamiento contenía alcohol, grupos Alc y A+C, mostraban valores de la ratio PSD-95/gefirina más elevados con respecto a los grupos con tratamiento sin alcohol, Sal y Coc. No se observaron efectos por sexo, ni interacción sexo-tratamiento. En la Tabla V se indica la significación estadística del análisis y en la Figura 22 se representa gráficamente los valores separados para machos y hembras.

**Tabla V.** Gefirina, PSD-95 y ratio PSD-95/gefirina

	CPFm	Hipocampo	NAc	Amígdala
<b>Gefirina</b>	n.s.	$F_{3,47}=2,93$ $p=0,046$ <b>Post hoc:</b> $Sal > Alc$ ; $p=0,024$ $Sal > C+A$ ; $p=0,019$ .	$F_{3,47}=3,38$ $p=0,028$ <b>Post hoc:</b> $Sal > Alc$ ; $p=0,001$ $Alc > Coc$ $p=0,006$	n.s.
<b>PSD-95</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>PSD-95/Gefirina</b>	n.s.	$F_{3,45}=4,66$ $p=0,007$ <b>Post hoc:</b> $Sal < Alc$ ; $p=0,013$ $Sal < C+A$ ; $p=0,003$ $Coc < C+A$ ; $p=0,015$	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento sobre PSD-95, gefirina y ratio PSD-95/gefirina. No se encontraron diferencias por sexo, ni interacción sexo-tratamiento. (n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino, Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol).



**Figura 22.** Valores relativos de las proteínas de anclaje gefirina y PSD-95 y de la ratio PSD-95/gefirina (media  $\pm$  EEM) tras la exposición de 21 días a los tratamientos: i) Coc (15mg/kg p.v.), ii) Alcohol (2gr/kg p.v.), iii) C+A (2gr/kg + 15 mg/kg p.v.) y iv) Control-Salino. Barras azules indican diferencias significativas entre grupos,  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2. Expresión génica de receptores

##### 4.2.2.1. Receptor NMDA, subunidades R1, 2A, and 2B: *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*

Los valores relativos de ARNm, como expresión de los genes *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, correspondientes a las subunidades de receptores NMDA R1, 2A, y 2B, respectivamente, se encuentran representados gráficamente en la Figura 23 y las diferencias significativas encontradas se recogen en las Tablas VI y VII.

***Grin1* subunidad NMDA1.** El ANOVA mostró un efecto de los tratamientos sobre la expresión de *Grin1* en CPFm y NAc, expresión relativa de ARNm, y una interacción



sexo-tratamiento en el hipocampo. El análisis *post hoc* reveló que, tanto en CPFm como en NAc, los tres grupos con tratamiento con droga Alc, Coc y C+A mostraron un descenso de los valores relativos de expresión con respecto al grupo salino. En hipocampo el estudio de efectos simples indicó que los machos-Coc mostraron una sobreexpresión de *Grin1* con respecto a las hembras-Coc. La significación estadística de estos resultados se detalla en la Tabla VI y gráficamente en la Figura 23.

**Tabla VI.** Diferencias significativas para la subunidad R1 del receptor de NMDA, *Grin1*

	CPFm	Hipocampo	NAc	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	$F_{3,34}=7,22$ ; $p=0,001$ <b>Post hoc:</b> $Sal > Alc$ ; $p=0,019$ $Sal > Coc$ $p=0,001$ $Sal > C+A$ ; $p<0,000$	n.s.	$F_{3,43}=4,26$ $p=0,011$ <b>Post hoc:</b> $Sal > Alc$ ; $p=0,005$ $Sal > Coc$ $p=0,004$ $Sal > C+A$ ; $p=0,004$	n.s.
<b>Sexo</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	$F_{3,44}=3,94$ $p=0,016$ <b>Efectos simples:</b> H-Coc > M-Coc ( $F_{1,10}=8,66$ , $p=0,006$ )	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor R1 de NMDA *Grin1*. n.s. = diferencias no significativas; Sal = grupo salino; Alc = grupo alcohol; Coc = grupo cocaína; C+A = grupo cocaína + alcohol.

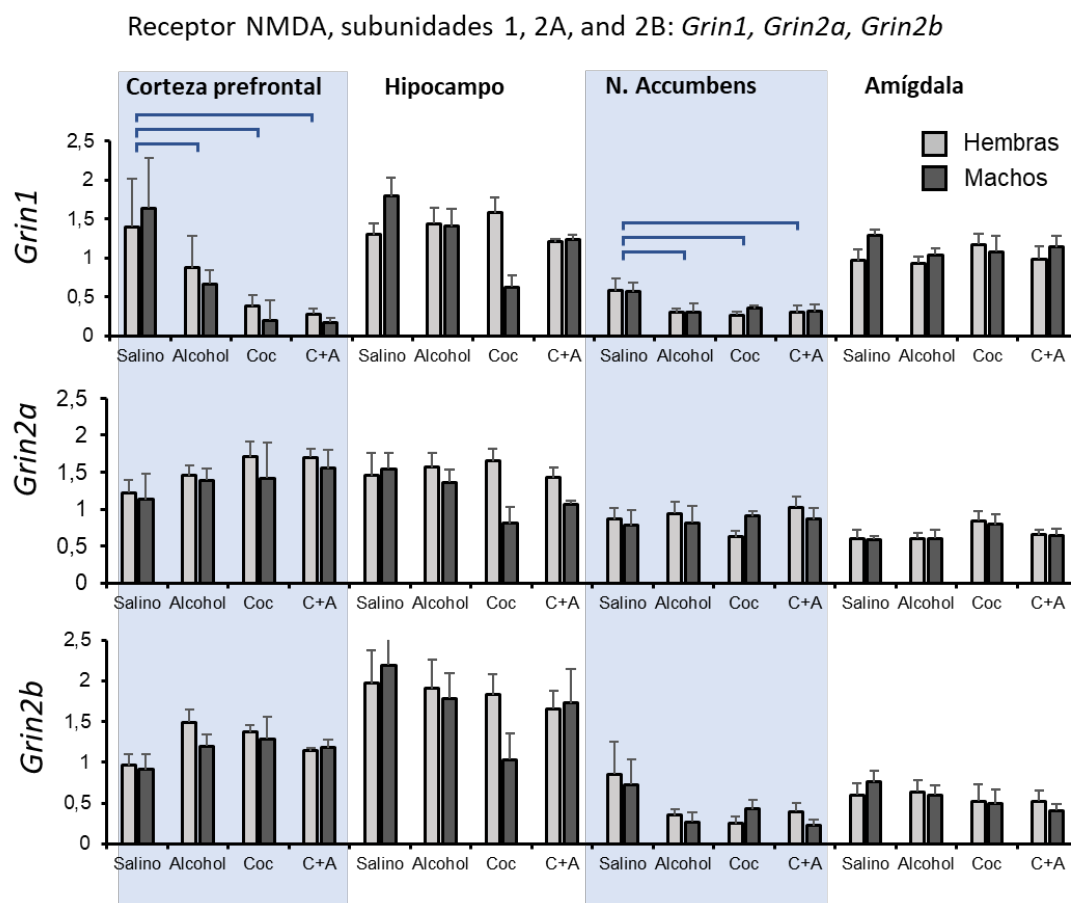
***Grin2a* subunidad NMDA2a.** Del análisis estadístico no se desprende que el tratamiento modifique la expresión de *Grin2a* en ninguna de las cuatro regiones, aunque se observó un efecto del factor sexo en el hipocampo, con valores más altos de las hembras respecto a los machos (Tabla VII y Figura 23).

**Tabla VII.** Diferencias significativas para la subunidad 2a del receptor de NMDA, *Grin2a*

	CPFm	Hipocampo	NAc	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo</b>	n.s.	H>M $F_{1,44}=4,46$ $p=0,042$	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor 2a de NMDA *Grin2a*. n.s. = diferencias no significativas; Sal = grupo salino; Alc = grupo alcohol; Coc = grupo cocaína; C+A = grupo cocaína + alcohol.

**Grin2b, subunidad NMDA 2b.** No se apreciaron diferencias en la expresión de este gen en ninguna de las cuatro regiones. Tampoco se encontraron diferencias por el sexo ni interacción sexo-tratamiento.



**Figura 23.** Niveles de ARNm (media  $\pm$  EEM), expresión relativa, de los receptores de glutamato tipo NMDA, subunidades R1, 2A, and 2B: *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b* tras la exposición de 21 días a los tratamientos: i) Coc (15mg/kg-p.v.), ii) Alc (2gr/kg-p.v.), iii) C+A (2gr/kg + 15 mg/kg-p.v.) y iv) Control-Salino. Barras azules indican diferencias significativas entre grupos,  $p < 0.05$ .

#### 4.2.2.2. Receptor AMPA subunidades 1 y 2: *Gria1*, *Gria2*

Los valores relativos de ARNm, como expresión de los genes *Gria1*, *Gria2* correspondientes a las subunidades de receptores AMPA 1 y 2, se encuentran representados gráficamente en la Figura 24 y las diferencias significativas encontradas se recogen en las Tablas VIII y IX.

***Gria1*, subunidad AMPA1.** El análisis estadístico no mostró que el factor tratamiento modificase la expresión de *Gria1* en ninguna de las cuatro regiones. Si se observó un

efecto del factor sexo en el hipocampo, que se muestra con valores más altos en las hembras respecto a los machos (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Diferencias significativas para la subunidad 1 del receptor AMPA, *Gria1*

	CPFm	Hipocampo	NAC	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo</b>	n.s.	H>M $F_{1,42}=4,46$ $p=0,015$	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

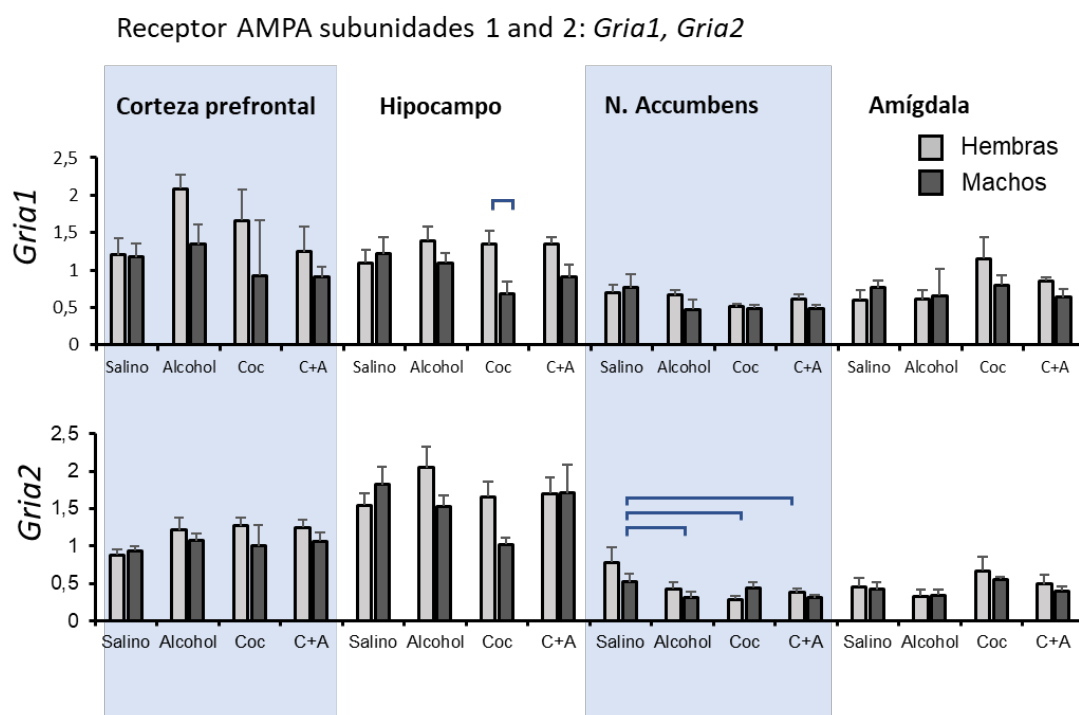
Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor R1 de AMPA *Gria1*. n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino, Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol.

***Gria 2*, subunidad AMPA2.** En el NAc el ANOVA mostró que hay un efecto del tratamiento sobre la expresión de este gen. El *post hoc* reveló una reducción significativa en los grupos Coc, Alc y C+A, respecto al grupo salino. La Tabla 24 muestra las variables estadísticas de dicho análisis. No se observó un efecto debido al factor sexo ni una interacción sexo-tratamiento.

**Tabla IX.** Diferencias significativas para la subunidad R2 del receptor de AMPA, *Gria2*

	CPFm	Hipocampo	NAC	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	n.s.	n.s.	$F_{3,45}=4,97$ $p=0,005$ <b>Post hoc:</b> <i>Sal &gt; Alc; <math>p=0,009</math></i> <i>Sal &gt; Coc <math>p=0,003</math></i> <i>Sal &gt; C+A; <math>p=0,002</math></i>	n.s.
<b>Sexo</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor R2 de AMPA *Gria2*. n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino, Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol.



**Figura 24.** Niveles de ARNm (media  $\pm$  EEM), expresión relativa, de los receptores de glutamato tipo AMPA subunidades 1 y 2: *Gria1*, *Gria2*, tras la exposición de 21 días a los tratamientos: i) Coc (15mg/kg-p.v.), ii) Alc (2gr/kg-p.v.), iii) C+A (2gr/kg + 15 mg/kg-p.v.) y iv) Control-Salino. Barras azules indican diferencias significativas entre grupos,  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2.3. Receptor GABA, subunidades alfa 1 y 2, gamma 2 y delta: *Gabra1*, *Gabra2*, *Gbrg2* y *Gabrd*.

Los valores relativos de ARNm, como expresión de los genes *Gabra1*, *Gabra2*, *Gbrg2* y *Gabrd*, correspondientes a las subunidades de receptores GABA alfa 1 y 2, gamma 2 y delta, se encuentran representados gráficamente en la Figura 25 y las diferencias significativas encontradas se recogen en las Tablas X, XI y XII.

**Receptor GABA, subunidad alfa 1, *Gabra1*.** No se observó que hubiera ningún efecto de los tratamientos sobre la expresión génica de esta subunidad. Tampoco se apreció un efecto del sexo ni interacción sexo-tratamiento.

**Receptor GABA, subunidad alfa 2, *Gabra2*.** En CPF y amígdala el ANOVA reveló un efecto del factor tratamiento sobre la expresión génica de *Gabra2*. El análisis *post hoc* indicó una sobreexpresión en los grupos Alc y Coc en la CPFm, tomando como referencia el grupo salino. El grupo Coc, a su vez, mostraba valores superiores a los del grupo

C+A. En amígdala se encontró que los grupos Alc y C+A mostraban una reducción significativa de la expresión de este receptor respecto al grupo salino. En Tabla X y Figura 25 se muestran gráficamente estos resultados.

**Tabla X.** Diferencias significativas para la subunidad alfa2 del receptor de GABA, *Gabra2*

	CPFm	Hipocampo	NAC	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	$F_{3,40}=5,64$ ; $p=0,003$ <b>Post hoc:</b> $Sal < Alc$ ; $p=0,014$ $Sal < Coc$ ; $p<0,000$ $Co > C+A$ ; $p=0,011$	n.s.	n.s.	$F_{3,41}=4,07$ $p=0,014$ <b>Post hoc:</b> $Sal > Alc$ ; $p=0,016$ $Sal > C+A$ ; $p=0,005$
<b>Sexo</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor alfa2 de GABA, *Gabra2*. n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino, Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol.

**Receptor GABA, subunidad gamma 2, *Gabrg2*.** El factor tratamiento mostró un efecto principal sobre la expresión génica de *Gabrg2* en CPFm. Del estudio *post hoc* se dedujo que los tres tratamientos distintos del salino mostraban valores inferiores a éste (Tabla XI). En la comparación del grupo Alc respecto al grupo C+A, este último mostró una expresión significativamente más reducida respecto al primero. No se encontró un efecto por el factor sexo ni interacción sexo-tratamiento.

**Tabla XI.** Diferencias significativas para la subunidad gamma2 del receptor de GABA, *Gabrg2*

	CPFm	Hipocampo	NAC	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	$F_{3,33}=10,16$ ; $p=0,000$ <b>Post hoc:</b> $Sal > Alc$ $p=0,006$ $Sal > Coc$ ; $p=0,000$ $Sal > C+A$ ; $p=0,000$ $Alc > C+A$ ; $p=0,008$	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor gamma2 de GABA, *Gabrg2*. n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino, Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol.

**Receptor GABA, subunidad delta, *Gabrd*.**

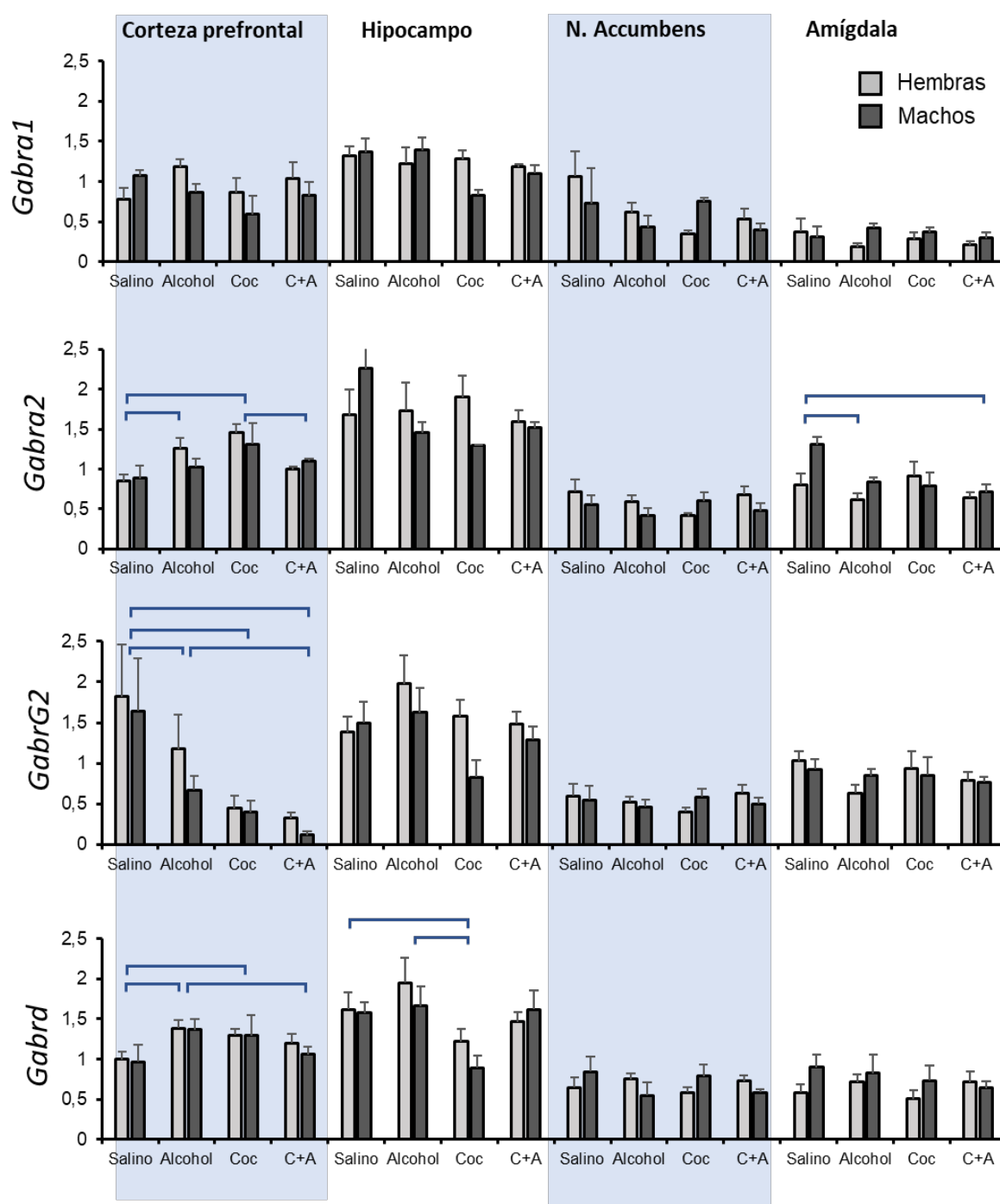
Las diferencias por efecto de los tratamientos se encontraron en CPFm e hipocampo (Tabla XII). El estudio *post hoc* para cada región reveló que en CPFm los grupos Alc y Coc mostraban una sobrerregulación respecto al grupo salino y el grupo C+A, a su vez, sobre el grupo Alc. En el hipocampo el grupo Coc tuvo unos valores significativamente inferiores a los de los grupos Salino y Alc.

**Tabla XII.** Diferencias significativas para la subunidad delta del receptor de GABA, *Gabrd*

	CPFm	Hipocampo	NAc	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	F <sub>3,42</sub> =3,42; <i>p</i> =0.012 <b>Post hoc:</b> Sal < Alc; <i>p</i> =0,003 Sal < Coc <i>p</i> =0,015 Alc < C+A; <i>p</i> =0,032	F <sub>3,46</sub> =3,39; <i>p</i> =0,028 <b>Post hoc:</b> Sal > Coc; <i>p</i> =0,005 Alc > Coc; <i>p</i> =0,004	n.s.	n.s.
<b>Sexo</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor delta de GABA, *Gabrd*. n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino, Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol.

Receptor GABA subunidades alfa 1 y 2, gamma 2 y delta: *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabrg2*, *Gabrd*



**Figura 25.** Niveles de ARNm (media  $\pm$  EEM), expresión relativa, de los receptores de GABA, subunidades alfa 1, alfa 2, gamma 2 y delta: *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabrg2* y *Gabrd*, tras la exposición de 21 días a los tratamientos: i) Coc (15mg/kg-p.v.), ii) Alc (2gr/kg-p.v.), iii) C+A (2gr/kg + 15 mg/kg-p.v.) y iv) Control-Salino. Barras azules indican diferencias significativas entre grupos,  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2.4. Sistema cannabinoide

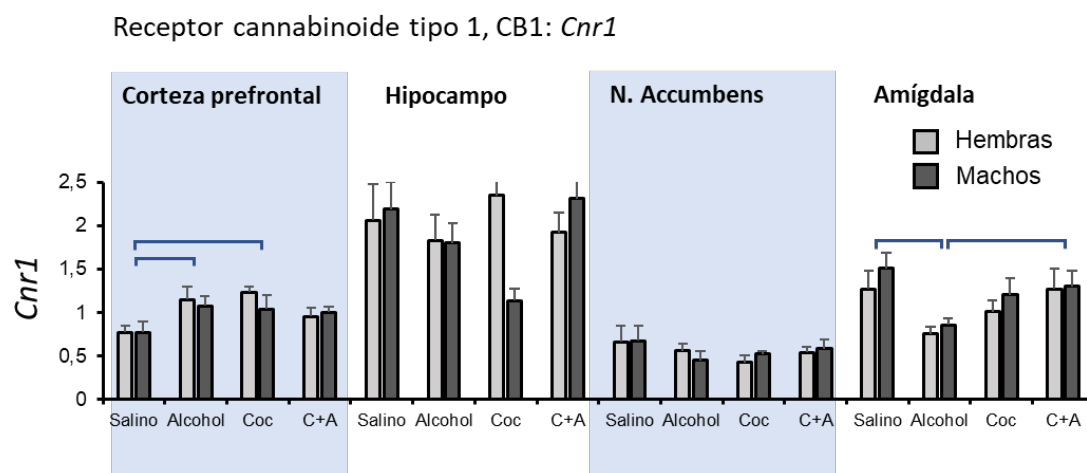
##### Receptor CB1, subunidad 1, *Cnr1*

La Figura 26 y la Tabla XIII muestran para las cuatro regiones el efecto de los tratamientos sobre la expresión del gen *Cnr1* que codifica el subtipo de receptor CB1 cannabinoide. Se apreciaron efectos significativos por los tratamientos en CPFm y amígdala. El análisis *post hoc* reveló una menor expresión del grupo salino respecto a los grupos Alc y Coc en la CPFm. En la Amígdala la caída se observó en el grupo Alcohol respecto a los grupos salino y C+A.

**Tabla XIII.** Diferencias significativas para el receptor cannabinoide CB1, *Cnr1*

	CPFm	Hipocampo	NAc	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	$F_{3,40}=3,96$ ; $p=0,016$ <b>Post hoc:</b> $Sal < Alc$ ; $p=0,004$ $Sal < Coc$ $p=0,002$	n.s.	n.s.	$F_{3,41}=3,93$ ; $p=0,017$ <b>Post hoc:</b> $Sal > Alc$ ; $p=0,003$ $Alc < C+A$ ; $p=0,011$
<b>Sexo</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor cannabinoide CB1, *Cnr1*. n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino, Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol.



**Figura 26.** Niveles de ARNm (media  $\pm$  EEM), expresión relativa, del receptor cannabinoide subunidad CB 1, *Cnr1*, tras la exposición de 21 días a los tratamientos: i) Coc (15mg/kg-p.v.), ii) Alc (2gr/kg-p.v.), iii) C+A (2gr/kg + 15 mg/kg-p.v.) y iv) Control-Salino. Barras azules indican diferencias significativas entre grupos,  $p < 0.05$



### Enzimas Faah, Nape-pld, Dagla y MglI

La Figura 27 muestra la expresión de ARNm de las enzimas Nade-pld y Dagla, implicadas en la biosíntesis de cannabinoides, y de las enzimas Faah y MglI, relacionadas con su degradación, para las cuatro estructuras anatómicas estudiadas. La CPFm es la región donde el efecto del alcohol y de la cocaína es más marcado, con diferencias en la expresión de las enzimas que tienen una función de degradación, Faah y MglI. Con respecto al hipocampo, la expresión de Dagla se alteró con la presencia de ambas drogas. Del análisis estadístico no se desprende que exista un efecto del sexo ni interacciones entre el tratamiento y el sexo para ninguna de las cuatro regiones.

La Figura 27 muestra también la expresión del ARNm de FAAH, que participa en la degradación de las aciletanolaminas. Los grupos con cocaína (Coc y C+A) mostraron una menor expresión que los grupos Sal y Alc. El análisis ANOVA mostró un efecto del tratamiento en la CPFm, y en el *post hoc* aparecen diferencias significativas en Coc y C+A, ambos respecto al grupo Alc (Tabla XIV).

**Tabla XIV.** Diferencias significativas de la expresión génica de las enzimas del metabolismo de los endocannabinoides: *Faah*, *MglI*, *Nape-pld* y *Dagla*

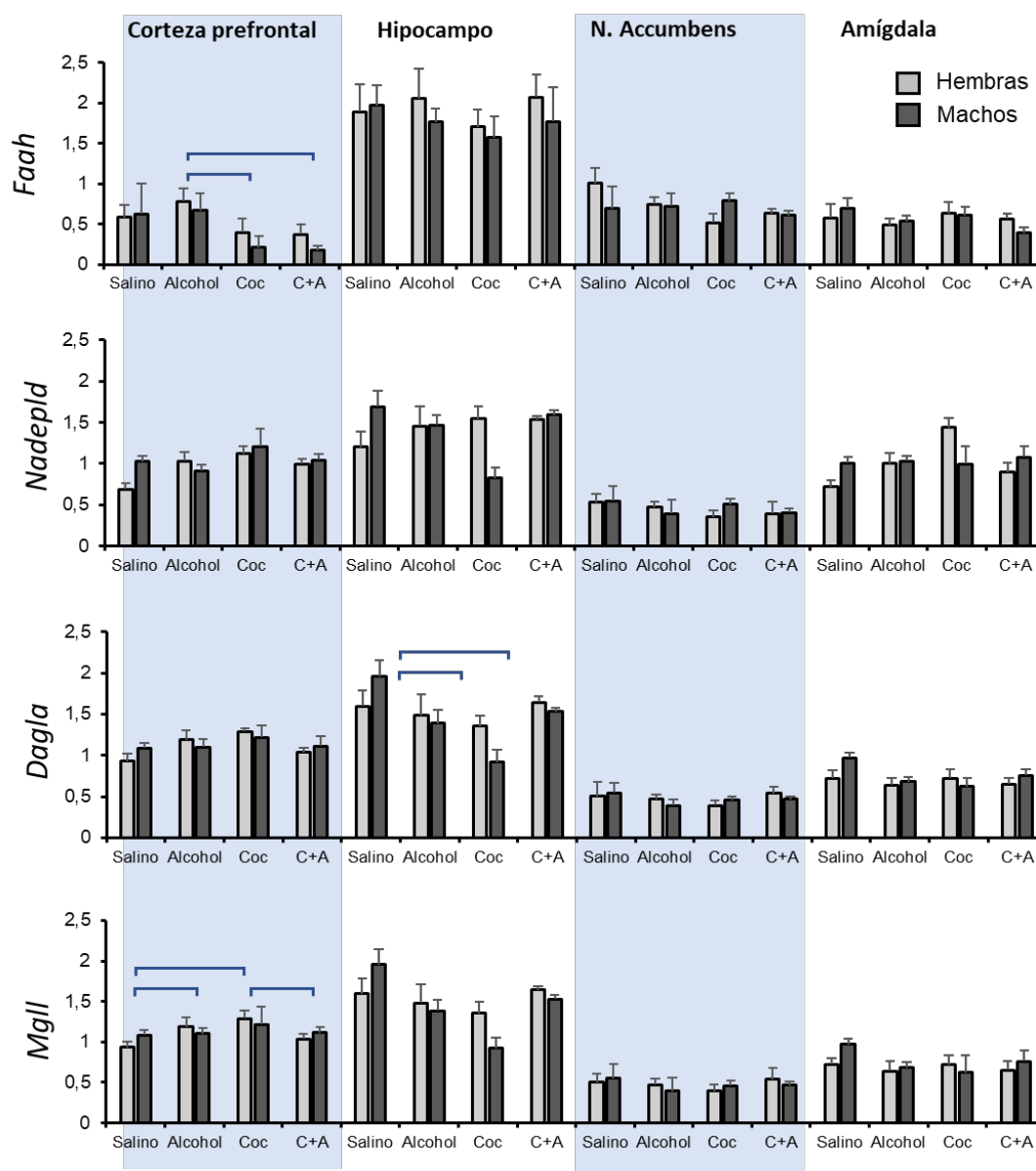
	CPFm	Hipocampo	NAC	Amígdala
<b><i>Faah</i></b>	$F_{3,36}=3,50$ ; $p=0,028$ <b>Post hoc:</b> $Alc > Coc$ ; $p=0,024$ $Alc > C+A$ ; $p=0,009$	n.s.	n.s.	n.s.
<b><i>MglI</i></b>	$F_{3,43}=3,42$ ; $p=0,028$ <b>Post hoc:</b> $Sal < Alc$ ; $p=0,03$ $Sal < Coc$ ; $p=0,016$ $Coc > C+A$ ; $p=0,036$	n.s.	n.s.	n.s.
<b><i>Nape-pld</i></b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b><i>Dagla</i></b>	n.s.	$F_{3,42}=4,05$ ; $p=0,015$ <b>Post hoc:</b> $Sal > Alc$ ; $p=0,05$ $Sal > Coc$ ; $p=0,004$	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm de las enzimas Faah, MglI, Nape-pld y Dagla relacionadas con el metabolismo de los endocannabinoides. n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino; Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol.

La expresión de *Mgll* se vio afectada por la exposición al alcohol y a la cocaína en la CPFm. El *post hoc*, Tabla XIV, mostró como tanto el grupo Alc como el Coc, mantenían valores superiores a los del grupo salino. Además, también hubo una expresión más elevada, estadísticamente significativa, del grupo Coc respecto a C+A.

En el hipocampo los grupos Coc y Alc mostraron una depleción, respecto al grupo salino, en la expresión del ARNm de la enzima *Dagla* Tabla XIV.

#### Enzimas con funciones en la síntesis y degradación de endocannabinoides



**Figura 27.** Niveles de ARNm (media  $\pm$  EEM), expresión relativa, de enzimas implicadas en el metabolismo de los endocannabinoides: *Faah*, *Napepld*, *Dagla*, *Mgll*, tras la exposición de 21 días a los tratamientos: i) Coc (15mg/kg-p.v.), ii) Alc (2gr/kg-p.v.), iii) C+A (2gr/kg + 15 mg/kg-p.v.) y iv) Control-Salino. Barras azules indican diferencias significativas entre grupos,  $p < 0,05$ .

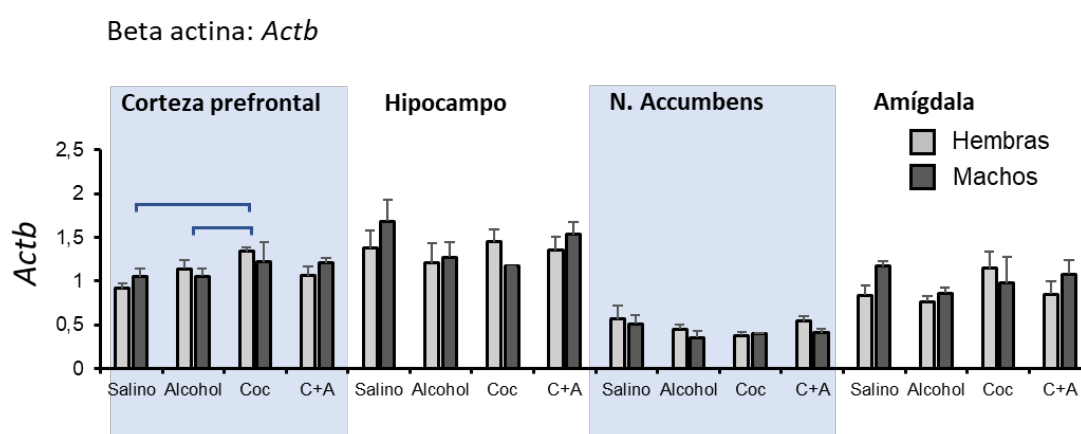
#### 4.2.2.5. Beta actin, *Actb*

La expresión del gen *Actb* de actina se encontró en CPFm más elevada en el grupo cocaína, tanto en su comparación con el salino como con el grupo Alc (ver tabla XV y Figura 28). No se observó un efecto por el sexo ni interacción sexo-tratamiento.

**Tabla XV.** Diferencias estadísticamente significativas para el receptor beta de actina: *Actb*

	CPFm	Hipocampo	NAC	Amígdala
<b>Tratamiento</b>	$F_{3,42}=3,32$ ; $p=0,031$ <b>Post hoc:</b> $Sal < Coc$ ; $p=0,001$ $Alc < Coc$ ; $p=0,021$	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Sexo X Trat.</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Efectos por el tratamiento, sexo e interacciones sexo x tratamiento sobre el ARNm del receptor beta de actina, *Actb*. n.s. = diferencias no significativas, Sal = grupo salino, Alc = grupo alcohol, Coc = grupo cocaína, C+A = grupo cocaína + alcohol



**Figura 28.** Niveles de ARNm (media  $\pm$  EEM), expresión relativa, del receptor de actina, subunidad Beta, *Actb*, tras la exposición de 21 días a los tratamientos: i) Coc (15mg/kg-p.v.), ii) Alc (2gr/kg-p.v.), iii) C+A (2gr/kg + 15 mg/kg-p.v.) y iv) Control-Salino. Barras azules indican diferencias significativas entre grupos,  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3. Perfil de metabolitos de cocaína en plasma.

Como parte de la validación de la metodología de administración simultánea de cocaína y alcohol se elaboró el perfil con los metabolitos disponibles en plasma procedentes de la metabolización de la cocaína y de los originados cuando ésta era administrada junto con alcohol. La finalidad fue tener constancia de que el cocaetileno

y otros metabolitos de la cocaína estaban presentes y en proporciones compatibles con la farmacocinética de esta sustancia. Mediante espectrometría de masas (LC-MS), se detectaron una serie de metabolitos presentes en plasma perteneciente a los grupos de ratas de 48 días al inicio de las sesiones de autoadministración, sin distinción de sexo, para los cuatro tratamientos.

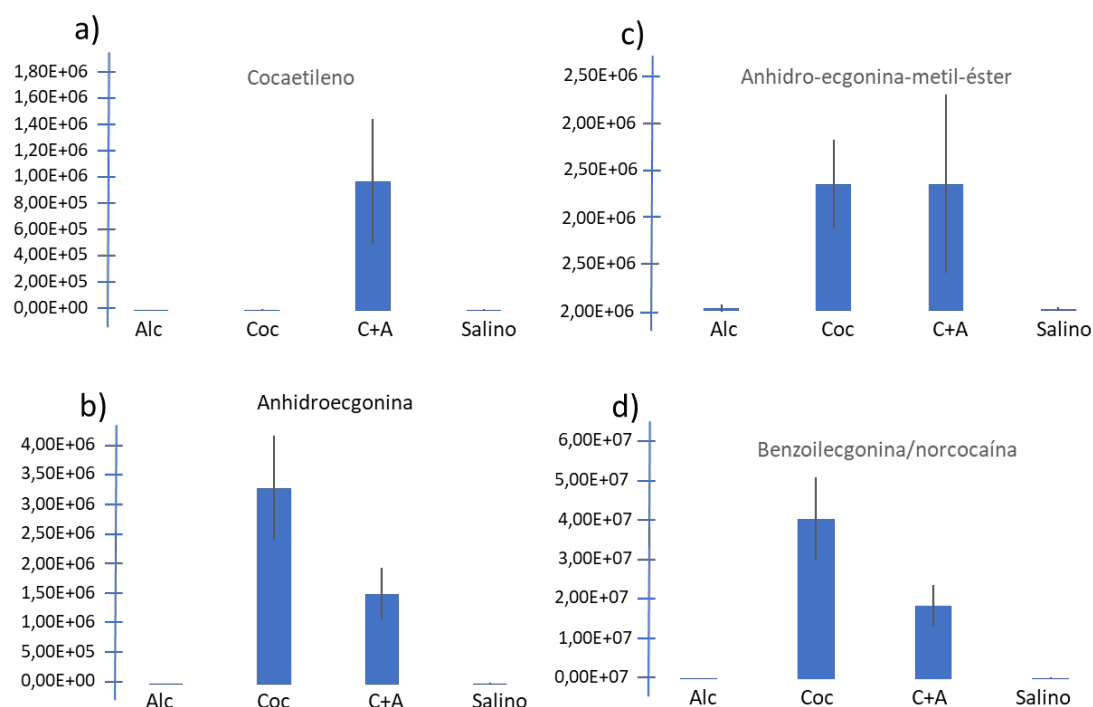
La Tabla XVI muestra los metabolitos propios de la metabolización de la cocaína y la Tabla XVII tres de los descritos cuando la cocaína es consumida junto con alcohol. Dada la semejanza molecular de algunos metabolitos, que comparten carga y masa, en determinados casos se generó un pico común a varias moléculas. La Figura 29 muestra gráficamente los hallazgos más destacables. Benzoil ecgonina y norcocaína compartieron el mismo pico en el análisis LC-MS, pues tienen una misma relación Q/m. Los dos grupos no expuestos a cocaína, salino y Alc, no mostraron la presencia de ninguno de los metabolitos.

**Tabla XVI.** Listado de metabolitos procedentes de la metabolización de la cocaína y sobre los que se puso interés en el análisis quimiométrico de los datos analíticos obtenidos

<b>Metabolito</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Cocaína</b>	Detección válida (Comparte pico con norcocaetileno)
<b>Ecgonina metil éster</b>	Detección válida
<b>Benzoilecgonina</b>	Detección válida (Comparte pico con norcocaína)
<b>Ecgonina</b>	Compuesto no detectado
<b>Norcocaína</b>	Detección válida (Comparte pico con benzoilecgonina)
<b>Benzoilnorecgonina</b>	Detección válida (Comparte pico con norcocaína)
<b>m-p-hidroxibenzoilecgonina</b>	Compuesto no detectado
<b>Anhidro-ecgonina-metil éster</b>	Detección válida
<b>Anhidroecgonina</b>	Detección válida
<b>Cocaína N-óxido m-phidroxicocaína</b>	Detección válida

**Tabla XVII.** Listado de metabolitos procedentes de la metabolización de la cocaína administrada junto con alcohol y sobre los que se puso interés en el análisis quimiométrico de los datos analíticos obtenidos

<b>Metabolito</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Cocaetileno</b>	Detección válida
<b>Norcocaetileno</b>	Detección válida (Comparte pico con cocaína)
<b>Ecgonina-etil éster</b>	Compuesto no detectado



**Figura 29.** Representación de los valores, abundancia relativa (media  $\pm$  DE) de algunos de los metabolitos plasmáticos de la cocaína.

#### 4.2.4. Perfil de aminoácidos libres en plasma

##### 4.2.3.1. Análisis factorial univariado

El análisis factorial ANOVA, modelo lineal general, mostró como la cocaína y el alcohol afectaron a la concentración plasmática de varios de los AA cuantificados. Los otros dos factores incluidos en el análisis, edad y sexo, también se mostraron con capacidad de alterar el perfil plasmático de AA. Se observaron diversas interacciones entre estos cuatro factores, que se exponen en las Tablas XVIII a XXI y en las Figuras 30 a 33.

La exposición a cocaína tuvo un efecto significativo sobre la concentración de cuatro AA (L-Iso, L-Leu, L-Glu y L-Ser). Estos cuatro AA mantuvieron valores superiores con la presencia en su tratamiento de cocaína, respecto a la concentración media de sus controles, los grupos sin cocaína (Salino y Alc). Destacan los valores especialmente elevados para L-Leu. La Tabla XVIII muestra las medias ( $\pm$  DE).

**Tabla XVIII.** Concentración ( $\mu\text{M/L}$ ; media $\pm$ DE) y significación estadística de los aminoácidos diferenciados por la exposición a cocaína.

<i>Aminoácido</i>	<b>Cocaína (M<math>\pm</math>DE)</b>	<b>No-cocaína (M<math>\pm</math>DE)</b>	<b>F</b>	<b>P-valor</b>
<b>L-Iso</b>	74,2 $\pm$ 12,74	65,74 $\pm$ 11,85	F <sub>1,90</sub> =9,18	p=0,003
<b>L-Leu</b>	125,83 $\pm$ 22,22	109,01 $\pm$ 16,97	F <sub>1,90</sub> =20,69	p<0,000
<b>L-Glu</b>	134,98 $\pm$ 33,23	113,93 $\pm$ 26	F <sub>1,90</sub> =12,88	P=0,001
<b>L-Ser</b>	225,65 $\pm$ 45,73	198,32 $\pm$ 30,88	F <sub>1,90</sub> =12,77	p=0,001

La Tabla XIX muestra los valores (media  $\pm$  DE) de las concentraciones ( $\mu\text{M/L}$ ) para los cuatro AA donde el análisis estadístico mostró alterados tras la exposición a alcohol (L-Ala, L-Gln, L-Orn y L-Ser). L-Ala y L-Ser tuvieron una depleción de sus valores, mientras que en L-Orn y L-Gln el alcohol tuvo un efecto opuesto, con un incremento de éstos.

**Tabla XIX.** Concentración ( $\mu\text{M/L}$ ) y significación estadística de los aminoácidos diferenciados tras la exposición crónica a alcohol.

<i>Aminoácido</i>	<b>Alcohol (M<math>\pm</math>DE)</b>	<b>No-alcohol (M<math>\pm</math>DE)</b>	<b>F</b>	<b>P-valor</b>
<b>L-Ala</b>	281,36 $\pm$ 48,87	327,75 $\pm$ 72,78	F <sub>1,90</sub> =11,48	p=0,001
<b>L-Gln</b>	786,25 $\pm$ 89,06	709,43 $\pm$ 85,8	F <sub>1,90</sub> =19,89	p<0.000
<b>L-Orn</b>	38,37 $\pm$ 16,52	31,94 $\pm$ 8,98	F <sub>1,90</sub> =5,45	p=0,022
<b>L-Ser</b>	198,34 $\pm$ 34,01	225,81 $\pm$ 43,64	F <sub>1,90</sub> =12,25	p=0,001

El factor sexo tuvo un efecto significativo sobre cinco AA (L-Iso, L-Leu, L-Gln, L-Orn y Gly) (Tabla XX), mostrando, por tanto, un patrón sexodimorfo. Los valores para tres AA (L-Iso, L-Leu y L-Gln) fueron significativamente superiores en las hembras respecto a los machos. Mientras que para L-Orn y Gly los machos tuvieron concentraciones medias significativamente superiores a las de las hembras.

**Tabla XX.** Concentración ( $\mu\text{M/L}$ ) y significación estadística de los aminoácidos con valores diferenciados según el sexo.

<i>Aminoácido</i>	<b>Machos (M<math>\pm</math>DE)</b>	<b>Hembras (M<math>\pm</math>DE)</b>	<b>F</b>	<b>P-valor</b>
<b>L-Iso</b>	67,34 $\pm$ 10,91	74,81 $\pm$ 12,55	F(1,90)=14,157	p<0.000
<b>L-Leu</b>	112,05 $\pm$ 20,62	122,42 $\pm$ 21,00	F(1,90)=8,67	p=0,004
<b>L-Gln</b>	730,45 $\pm$ 101,84	768,64 $\pm$ 84,93	F(1,90)=7,14	p=0,009
<b>L-Orn</b>	40,18 $\pm$ 15,35	30,41 $\pm$ 8,14	F(1,90)=12,47	p=0.001
<b>Gly</b>	334,56 $\pm$ 57,26	263,34 $\pm$ 51,92	F(1,90)=38,82	p<0.000

El factor de la edad de inicio de los tratamientos tuvo un efecto principal significativo sobre tres AA: L-Iso, L-Leu y L-Gln (Tabla XXI). Tanto L-Gln como L-Leu tuvieron medias superiores en las ratas adultas, mientras que para L-Iso mostraron

unas concentraciones con medias significativamente más elevadas en las ratas jóvenes.

**Tabla XXI.** Concentración ( $\mu\text{M/L}$ ) y significación estadística de los aminoácidos con valores diferenciados según la edad al inicio de los tratamientos

<i>Aminoácido</i>	<i>Jóvenes (M<math>\pm</math>DE)</i>	<i>Adultos(M<math>\pm</math>DE)</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<b>L-Iso</b>	74,54 $\pm$ 13,49	68,31 $\pm$ 10,55	F(1,90)=9,42	<i>p</i> =0.003
<b>L-Leu</b>	113,33 $\pm$ 19,39	122,11 $\pm$ 22,87	F(1,90)=5,27	<i>P</i> =0.025
<b>L-Gln</b>	732,03 $\pm$ 90,95	771,44 $\pm$ 96,97	F(1,90)=6,74	<i>p</i> =0,011

### Interacciones entre cocaína y alcohol

En dos AA se encontró una interacción Cocaína x Alcohol, L-Iso ( $F_{1,90}=9,22$ ;  $p=0,003$ ) y L-Ser ( $F_{1,90}=4,84$ ;  $p=0,038$ ). Para L-Iso, en las comparaciones de medias por parejas se observó que, entre los sujetos expuestos a cocaína los valores de este aminoácido fueron significativamente inferiores cuando ésta concurre con alcohol, Grupo C+A, 70,8 $\pm$ 11,78  $\mu\text{M/L}$  respecto a su administración única, Grupo Coc, 77,8 $\pm$ 8,9  $\mu\text{M/L}$ . ( $F_{1,44}=4,03$ ;  $p<0,048$ ). También, se comprobó que cuando el alcohol no está en el tratamiento se producen efectos diferentes sobre L-Iso, según haya o no cocaína, manteniendo valores más altos cuando si está presente la cocaína 77,91 $\pm$ 9,81  $\mu\text{M/L}$ , respecto a si no está incluida 65,71  $\pm$  9,05  $\mu\text{M/L}$  ( $F_{1,43}=11,6$ ;  $p=0,028$ ).

Para L-ser se observó que, entre los sujetos expuestos a cocaína, los valores de este aminoácido fueron significativamente inferiores cuando ésta concurrió con alcohol 205,07 $\pm$ 32,84  $\mu\text{M/L}$ , respecto a su ausencia en el tratamiento 248,2 $\pm$ 47,41  $\mu\text{M/L}$  ( $F_{1,44}=9,33$ ;  $p=0,003$ ). También, se observó que cuando el alcohol no está en el tratamiento se producen efectos diferentes sobre L-Iso, según haya o no cocaína, manteniendo valores más altos cuando la cocaína está presente 205,07 $\pm$ 32,84  $\mu\text{M/L}$  respecto a su ausencia 192,71 $\pm$ 30,11  $\mu\text{M/L}$  ( $F_{1,43}=15,98$ ;  $p<0,000$ ).

### Interacciones entre cocaína y sexo

En dos AA se encontró una interacción Cocaína x Sexo, L-Leu ( $F_{1,90}=4,9$ ;  $p=0,003$ ) y L-Pro ( $F_{1,90}=5,32$ ;  $p=0,024$ ). Para L-Leu, en las comparaciones de medias por parejas, se observó que machos y hembras mostraban valores similares si su tratamiento contenía cocaína, pero en su ausencia diferían de forma significativa, con

unas concentraciones inferiores para ambos sexos, pero más acusadas en machos. En ausencia de cocaína en el tratamiento, los machos mostraron una concentración inferior de L-Leu  $99,56 \pm 12,42 \mu\text{M/L}$ , respecto a la de las hembras  $118,48 \pm 12,53 \mu\text{M/L}$  ( $F_{1,46}=11,74$ ;  $p<0,001$ ). Dentro del conjunto de sujetos macho, los que estuvieron expuestos a cocaína mostraban valores significativamente más elevados  $125,09 \pm 17,7 \mu\text{M/L}$  en comparación con los que no tuvieron esta droga en su tratamiento  $99,87 \pm 12,14 \mu\text{M/L}$  ( $F_{1,45}=20,97$ ;  $p<0,0001$ ).

Para L-Pro, el análisis de efectos simples mostró que entre los sujetos expuestos a cocaína los valores de este aminoácido son significativamente superiores en los machos  $165 \pm 47,12 \mu\text{M/L}$ , respecto a las hembras  $138,87 \pm 28,38 \mu\text{M/L}$  ( $F_{1,44}=5,91$ ;  $p=0,017$ ). Sucedió lo contrario en ausencia de cocaína, con niveles de L-Pro significativamente más elevados en las hembras  $165,7 \pm 74 \mu\text{M/L}$  respecto a los machos  $156,26 \pm 26 \mu\text{M/L}$  ( $F_{1,46}=6,34$ ;  $p<0,013$ ).

### Interacciones entre alcohol y sexo

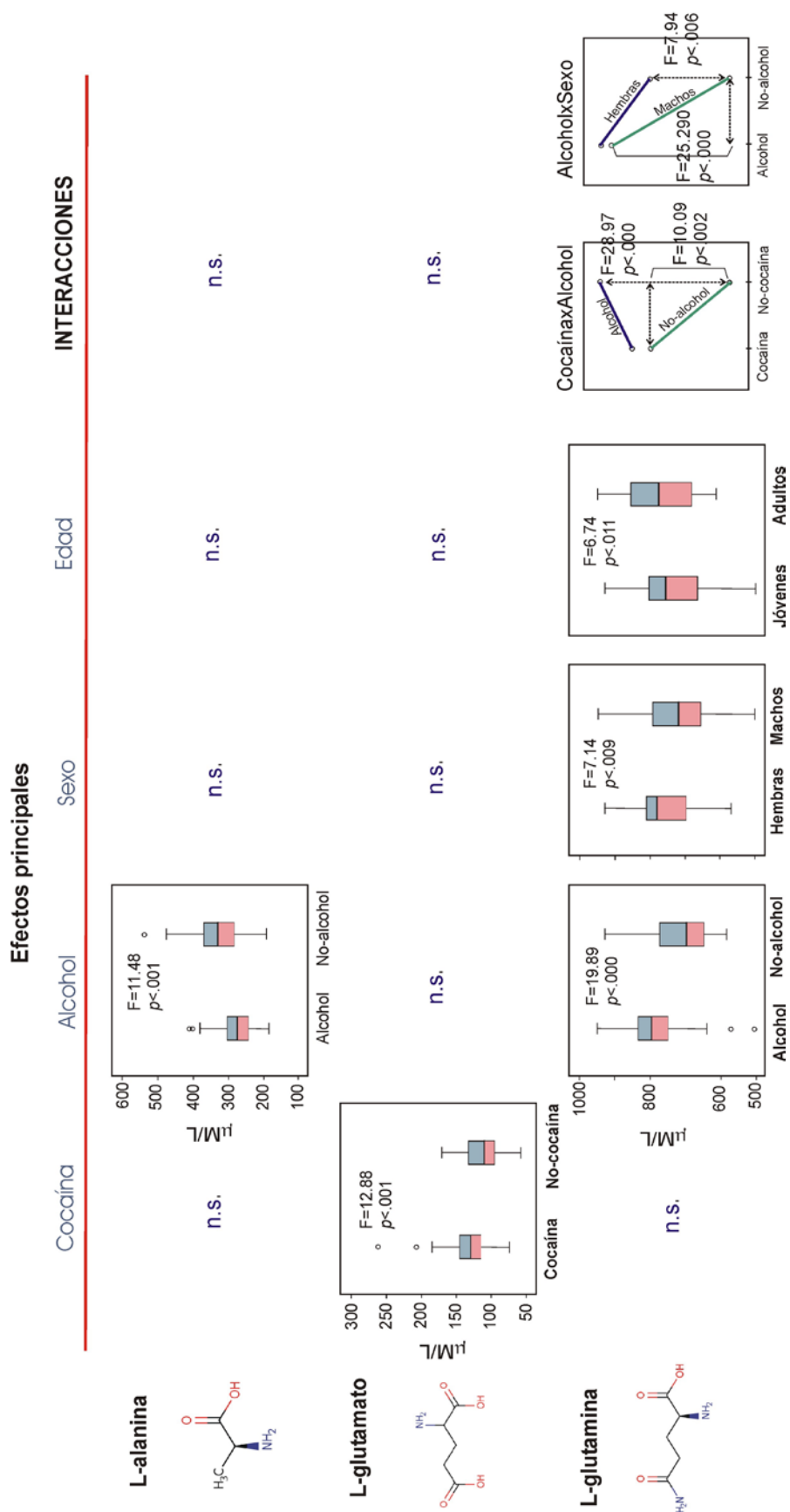
En tres AA se encontró una interacción *Alcohol x Sexo*, L-Iso ( $F_{1,90}=5,62$ ;  $p=0,02$ ), L-Gln ( $F_{1,90}=4,28$ ;  $p=0,042$ ) y L-Orn ( $F_{1,90}=4,96$ ;  $p=0,029$ ). Para el aminoácido L-Iso, en las comparaciones de medias por parejas, se observó que machos y hembras mostraban valores similares en presencia de alcohol en el tratamiento, pero en su ausencia diferían de forma significativa con un patrón opuesto, los valores de los machos eran significativamente inferiores a los de las hembras. Las hembras alcanzaron una media de  $82,84 \pm 8,28 \mu\text{M/L}$  respecto a los machos  $72,45 \pm 11,5 \mu\text{M/L}$ , en ausencia de alcohol ( $F_{1,43}=12,76$ ;  $p<0,001$ ).

Dentro del conjunto de las ratas macho, las que estuvieron expuestas al alcohol mostraron valores significativamente más elevados de L-Gln,  $781,42 \pm 99,02 \mu\text{M/L}$  respecto a los que no tuvieron esta droga en su tratamiento  $672,24 \pm 54 \mu\text{M/L}$ , ( $F_{1,45}=25,29$ ;  $p<0,0001$ ). Las hembras tuvieron un descenso más suave, no significativo, por lo que en la comparación entre machos y hembras en ausencia de alcohol se aprecia una diferencia significativa a favor de los machos ( $F_{1,43}=7,94$ ;  $p<0,006$ ).

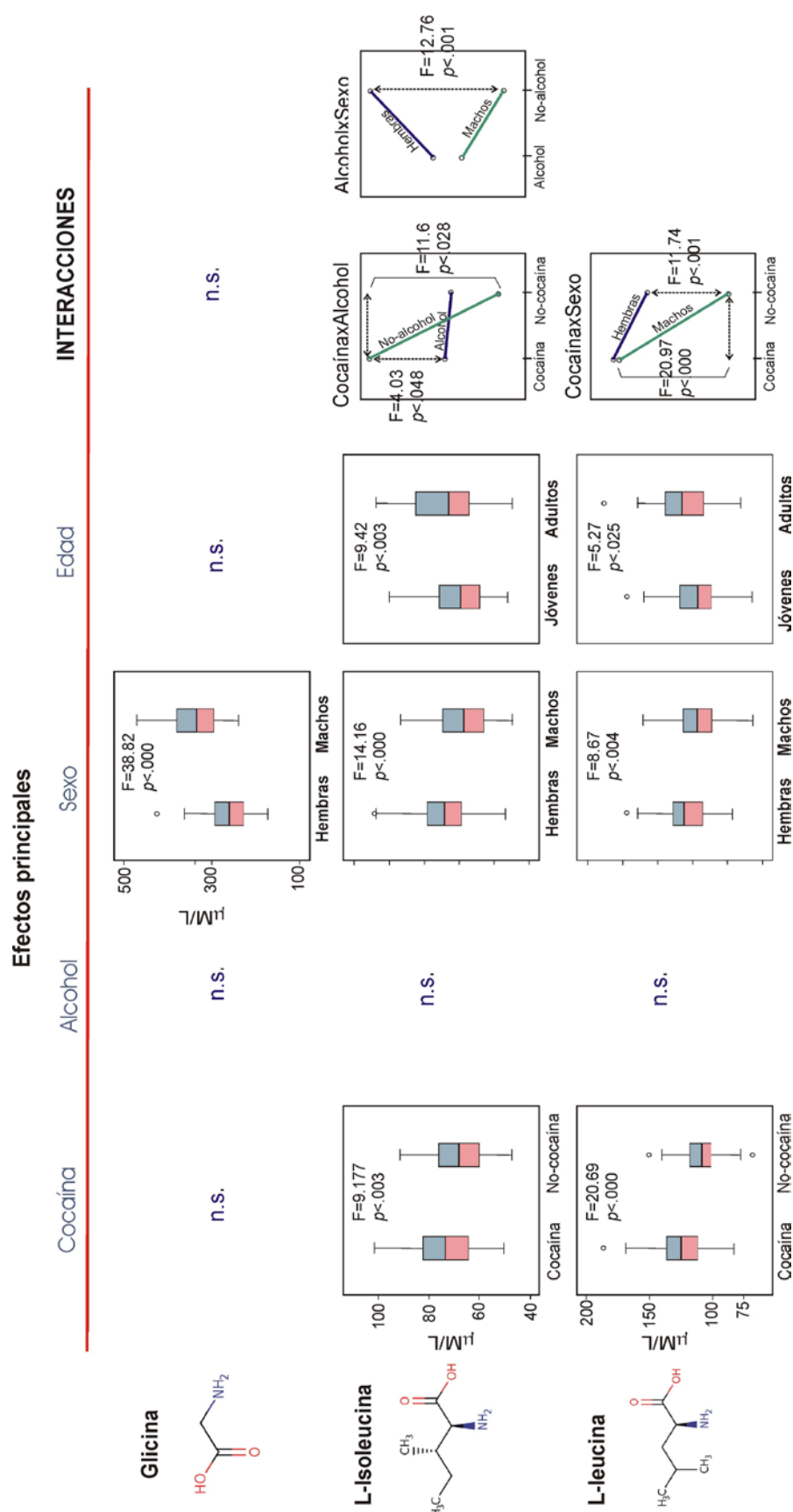
Para L-Orn se observó que entre los sujetos expuestos a alcohol los valores de este aminoácido son significativamente más elevados en los machos  $45,6 \pm 15,8 \mu\text{M/L}$ ,



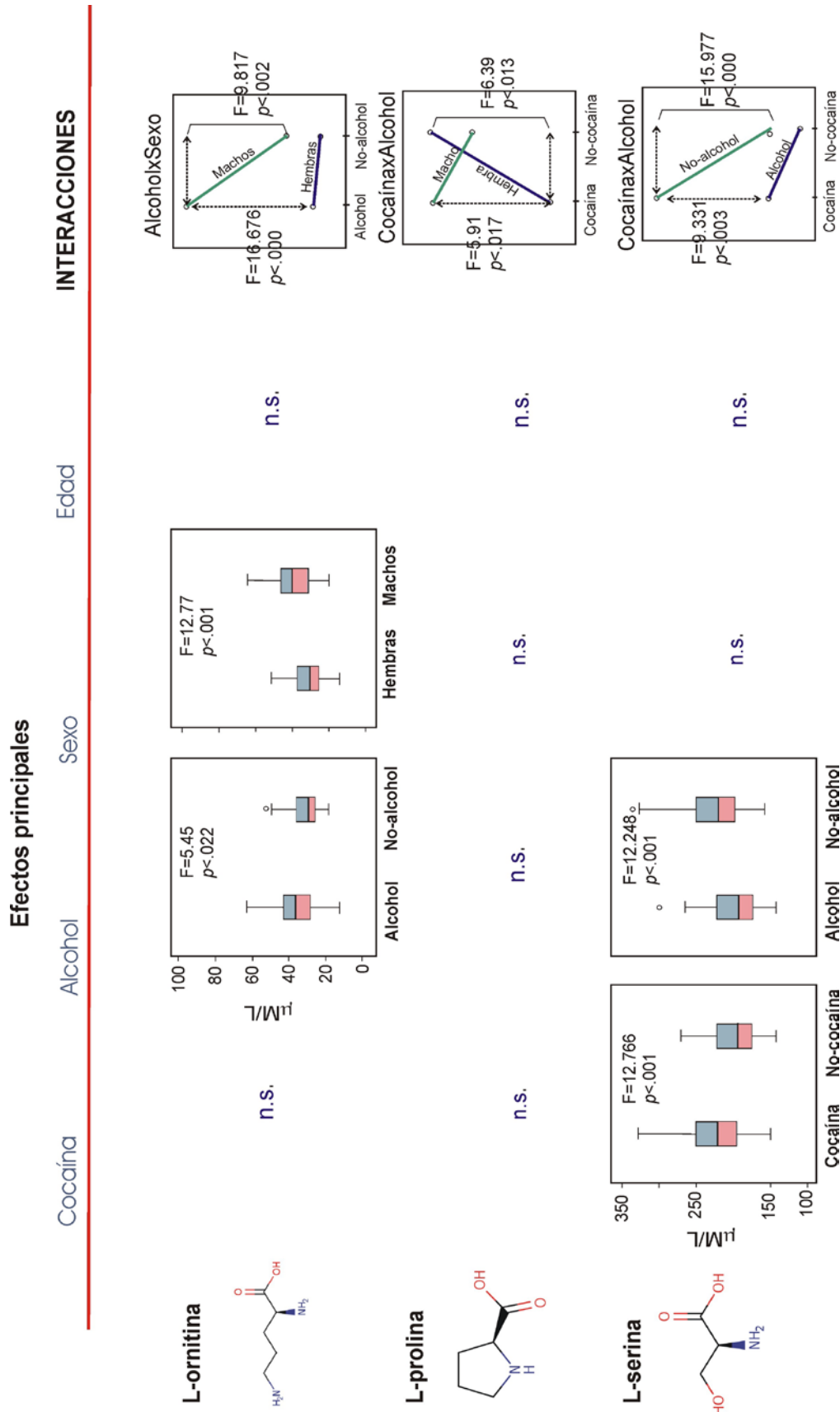
respecto a las hembras  $30,83 \pm 8,88 \mu\text{M/L}$  ( $F_{1,47}=16,68$ ;  $p<0,0001$ ). El valor de este aminoácido no se vio alterado en las hembras por el alcohol.



**Figura 30.** Gráfico de cajas con bigotes que muestra los efectos de los factores; cocaína, alcohol, sexo y edad sobre las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos L-Ala, L-Glu y L-Gln. Caja: percentil 25-mediana-percentil 75; Bigotes: máximo y mínimo valor o 1,5 veces el rango intercuartílico. Puntos: outliers.



**Figura 31.** Gráfico de cajas con bigotes que muestra los efectos de los factores; cocaína, alcohol, sexo y edad sobre las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos Glicina, L-Isoleucina y L-Leucina. Caja: percentil 25-mediana-percentil 75; Bigotes: máximo y mínimo valor o 1,5 veces el rango intercuartílico. Puntos: outliers.

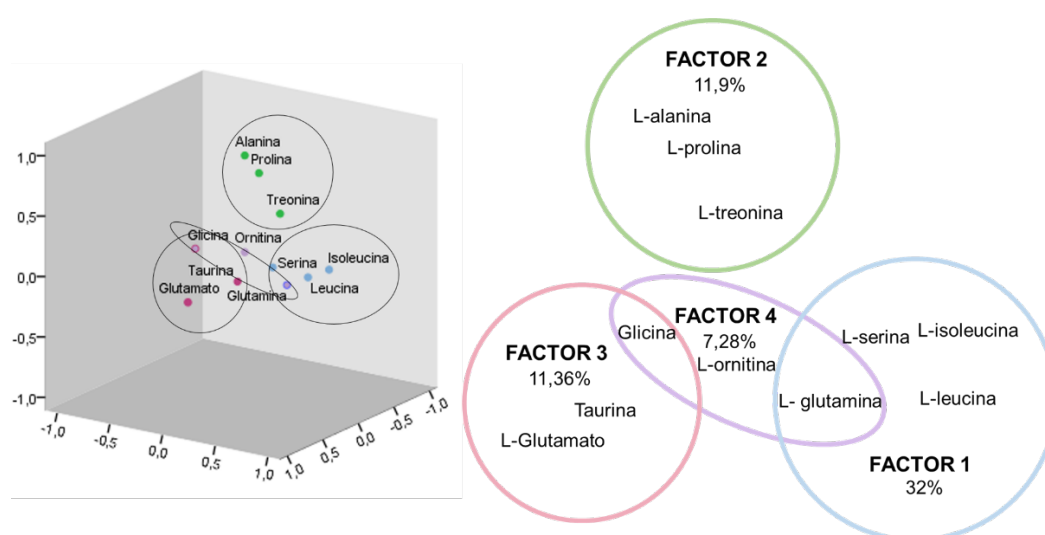


**Figura 32.** Gráfico de cajas con bigotes que muestra los efectos de los factores; cocaína, alcohol, sexo y edad sobre las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos L-Orn, L-Pro y L-Ser. Caja: percentil 25-mediana-percentil 75; Bigotes: máximo y mínimo valor o 1,5 veces el rango intercuartílico. Puntos: outliers.

#### 4.2.4.2. Análisis multivariado (análisis factorial exploratorio)

##### Extracción de factores

Cuatro factores proporcionaron un mejor ajuste y explicaban un 62,55 % de la varianza. En los cuatro factores extraídos intervienen entre tres y cuatro variables obteniéndose un primer factor (F1), en el que las variables L-Iso y L-Leu tuvieron pesos altos (0.97 y 0.76 respectivamente) y L-Gln (0.52) y L-Ser (0.45) tuvieron saturaciones medias. En el Factor 2 (F2) L-Ala es la que tuvo un peso más alto (0.91) seguida de L-Pro (0.78) y L-Thr (0.41). En el Factor 3 (F3) la variable de mayor peso fue L-Glu (0.89), mientras que Tau (0.58) y Gly (0.42) tuvieron pesos más bajos. Finalmente, en el Factor 4 (F4) pesaba principalmente L-Orn (0.82), mientras que L-Gln (0.46) y Gly (0.41) tenían un peso menor y además estas variables también tuvieron pesos medios en el Factor 1 y el Factor 3 respectivamente, por lo que había cierto solapamiento entre los factores (Figura 33).



**Figura 33.** Gráfico que muestra, a la izquierda, los factores rotados y la representación de la estructura factorial obtenida, a la derecha. El porcentaje es la proporción de varianza explicada por cada factor.

##### Análisis de Varianza de los factores extraídos

Las puntuaciones factoriales calculadas anteriormente, para cada una de las cuatro dimensiones identificadas (F1, F2, F3 y F4) se introdujeron como variables dependientes en sucesivos ANOVAs mediante un diseño factorial siendo los factores: sexo, edad (joven y adulto) y tratamiento, este último con cuatro niveles que correspondían a los grupos (salino, Alc, Coc, C+A).

### Factor 1.

En el ANOVA de F1 se encontraron diferencias significativas por *sexo* ( $F_{1,73}=26,31$ ;  $p<0,001$ ), *edad* ( $F_{1,73}=14,14$ ;  $p<0,001$ ), *tratamiento* ( $F_{3,73}=9,28$ ;  $p<0,001$ ) y en la interacción doble entre *sexo x tratamiento* ( $F_{3,73}=3$ ;  $p<0,05$ ). La interacción doble entre *edad x tratamiento* y *sexo x edad* no fueron significativas, como tampoco lo fue la interacción triple entre *sexo x edad x tratamiento*.

En las comparaciones por pares con la corrección de Bonferroni se estudiaron los efectos simples en la interacción *sexo y tratamiento*. En las hembras hubo diferencias significativas entre cocaína vs. salino ( $p<0,001$ ), cocaína vs. alcohol ( $p<0,05$ ) y cocaína vs. alcohol + cocaína ( $p=0,001$ ). En los machos las diferencias significativas se observaron entre salino vs. cocaína ( $p<0,05$ ) y entre salino vs. cocaína + alcohol ( $p<0,05$ ). Entre machos y hembras hubo diferencias significativas en salino ( $p<0,05$ ), cocaína ( $p<0,05$ ) y en el grupo alcohol se tendía a la significación ( $p<0,056$ ). Sin diferencias entre machos y hembras en cocaína + alcohol.

### Factor 2

El ANOVA para F2 arrojó resultados significativos en función del tratamiento ( $F_{3,73}=3,38$ ;  $p<0,05$ ). No hubo efectos principales de *edad*, *sexo*, ni interacciones dobles entre *sexo x edad*, *sexo x tratamiento* y *edad x tratamiento*. La interacción triple entre *sexo x edad x tratamiento* tampoco fue significativa. En el análisis *post hoc* con la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas entre el grupo salino vs. cocaína + alcohol, en el contraste de medias ( $t(85)=3,23$ ;  $p<0,05$ ). La media de la puntuación en esta dimensión fue superior en el grupo salino ( $M=0,48$ ) frente al grupo cocaína + alcohol ( $M=-0,41$ ), este último grupo puntuaba alto, pero en sentido negativo.

### Factor 3

En F3 se encontró un efecto principal de tratamiento ( $F_{3,73}=5,23$ ;  $p<0,05$ ). En el *post hoc* con la prueba de Tukey las diferencias significativas se observaron entre el grupo con administración de *cocaína vs. alcohol* ( $t(85)=3,58$ ;  $p<0,001$ ). Ambos grupos obtuvieron puntuaciones similares, pero en sentido opuesto; positivo en el grupo de cocaína ( $M=0,52$ ) y negativo en el grupo con alcohol ( $M=-0,41$ ). En cuanto al factor *edad*, tendía a la significación ( $F_{1,73}=3,93$ ;  $p=0,05$ ). En las ratas adultas se obtuvo una

media de  $M=-0,20$  y en las jóvenes de  $M=0,16$ . No se encontraron diferencias significativas en función del sexo y tampoco hubo interacciones dobles o triples.

#### **Factor 4**

Las comparaciones en F4 mostraron que había diferencias significativas en función de sexo ( $F_{1,73}=16,21$ ;  $p<0,001$ ), con  $M=-0,34$  en las hembras y  $M=0,35$  en los machos y en función de tratamiento ( $F_{1,73}=5,81$ ;  $p<0,05$ ). La prueba de Tukey mostró que las diferencias se encontraban entre el grupo salino vs. alcohol ( $t(85)=3,47$ ;  $p=0,001$ ),  $M=-0,50$  en el grupo salino y  $M=0,37$  en la condición alcohol; y entre salino vs. alcohol+cocaína [ $t(85)=2,90$ ;  $p<0,05$ ],  $M=0,24$  en el grupo alcohol + cocaína. Sin efecto principal de edad ni interacciones significativas.

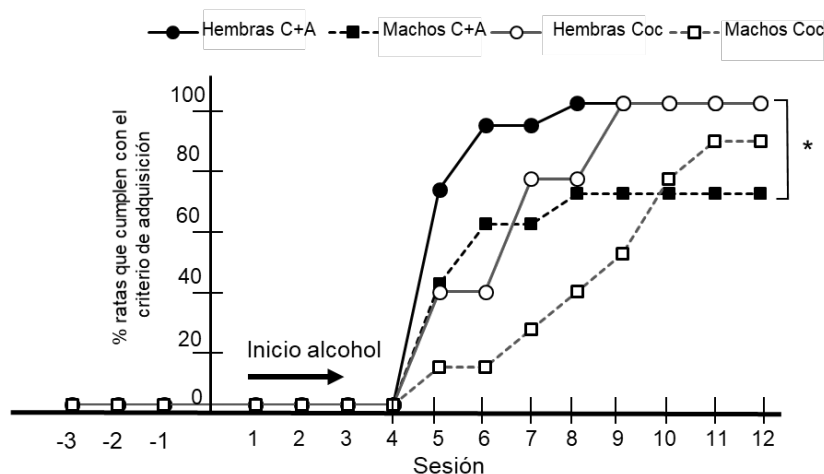
### 4.3. Resultados del Estudio III

En este tercer estudio se sustituyó la administración pasiva, empleada en los dos primeros, por un modelo más ecológico de autoadministración intravenosa. Se emplearon ratas jóvenes adultas de ambos sexos. El primer objetivo fue estudiar algunas características básicas de la curva de autoadministración, como la adquisición y el mantenimiento, con cocaína más alcohol durante 21 días. Como segundo objetivo se estudiaron los efectos que este policonsumo pudiera tener sobre las concentraciones plasmáticas de catorce aminoácidos.

#### 4.3.1. Estudio conductual

##### 4.3.1.1. Adquisición de la conducta de autoadministración

La Figura 34 muestra los porcentajes de ratas hembras y machos de los grupos C+A y Coc que cumplieron en cada sesión con el criterio de adquisición establecido. El 100% de las hembras cumplieron las condiciones de adquisición en el periodo de 12 días, con una media ( $\pm$  DE) de sesiones: hembras-Coc ( $6,8 \pm 1,67$ ) y hembra C+A ( $7,4 \text{ días} \pm 1,99$ ). Respecto a los machos, el 70% de C+A ( $10,4 \pm 4,93$ ) y el 87,5 % de los machos Coc ( $9,1 \pm 2,47$ ). Ninguna de las ratas del grupo salino cumplió con los criterios de adquisición. Teniendo en cuenta el factor sexo estratificado por grupo de tratamiento (COC y C+A), las diferencias fueron significativas entre machos y hembras del grupo C+A [ $\chi^2$  (1, N = 40) = 4.94,  $p < 0.05$ ]. No se encontraron diferencias entre machos y hembras del grupo Coc.



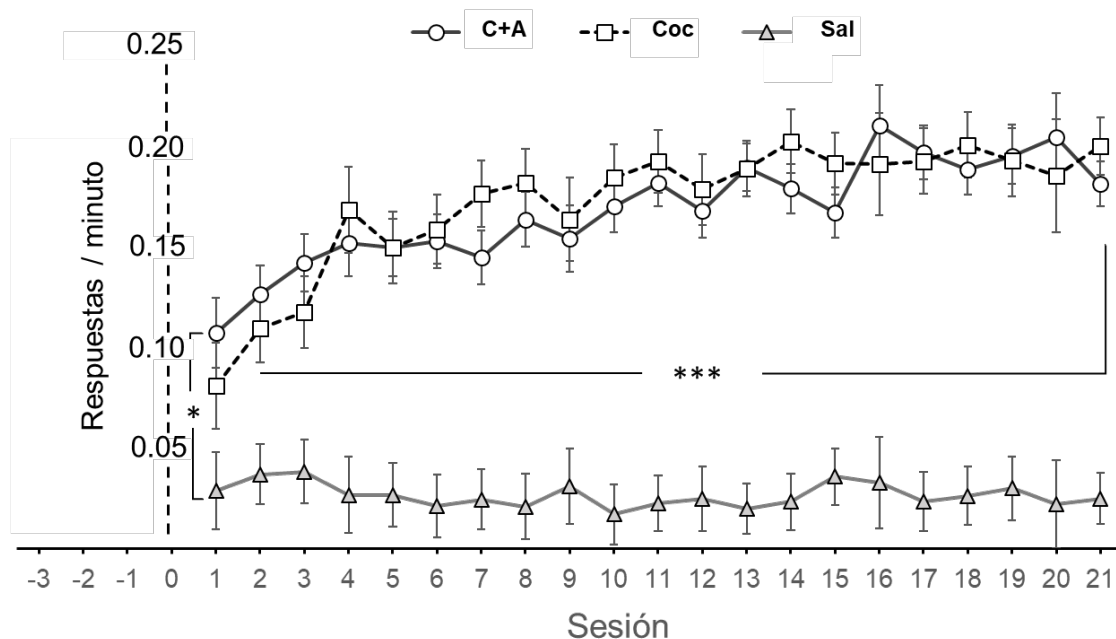
**Figura 34.** Porcentaje de ratas por sexo y tratamiento que alcanzaron el criterio de adquisición en las 12 primeras sesiones.



#### 4.3.1.2 Mantenimiento de la conducta de autoadministración intravenosa de drogas

La figura 35 muestra, para los tres tratamientos, la curva de autoadministración durante los 21 días del experimento, desde el inicio de la incorporación del alcohol a las ratas del grupo C+A. En el factor intra-sujeto, se encontró un efecto principal significativo de Sesión ( $F_{2,92;157,87}=6,14$ ;  $p<0,001$ ) y de la interacción *Sesión x Tratamiento* ( $F_{5,85;157,87}=7,89$ ;  $p<0,001$ ). No se encontraron efectos de la interacción *Sesión x Sexo* o de *Sesión x Tratamiento x Sexo*. Atendiendo a los efectos simples de la interacción significativa, las diferencias se encontraron desde la sesión 4, cuando se comenzó la administración del alcohol en el grupo que recibió esta sustancia de forma conjunta con la cocaína, ( $F_{2,54}=6,78$ ;  $p<0,05$ ). En esta sesión, el grupo con administración de salino difería del grupo con administración de cocaína y alcohol ( $p<0,05$ ), con una tasa de respuestas mayor en el grupo con administración de ambas drogas respecto al salino, sin diferencias significativas entre Coc vs. Sal y Coc vs. C+A. A partir del día 5 los efectos simples arrojaron diferencias significativas ( $F_{2,54}=9,92$ ;  $p<0,001$ ), concretamente entre salino vs. cocaína ( $p<0,05$ ) y salino vs. cocaína + alcohol ( $p<0,001$ ), con una tasa de respuestas significativamente mayor en los grupos con drogas que en el grupo salino, sin diferencias entre Coc vs. C+A. Estas diferencias se mantuvieron hasta el final del experimento.

En cuanto a los efectos de los factores entre-grupos, se encontró un efecto principal de Tratamiento ( $F_{46,67;157,87}=46,67$ ;  $p<0,001$ ). Los contrastes planificados ortogonales (contrastos de Helmert) respecto a este factor mostraron diferencias significativas entre el grupo control salino y los grupos con administración de drogas considerados de forma conjunta, salino vs cocaína y cocaína + alcohol ( $p<0,001$ ) sin diferencias significativas en el contraste entre los grupos con administración de cocaína sola o en combinación con el alcohol ( $p>0,05$ ). Las pruebas *post hoc* mediante el estadístico de Gabriel (también Tukey) confirmaron estos resultados salino vs. cocaína  $p<0,001$ , salino vs. cocaína + alcohol  $p<0,001$ , cocaína vs. cocaína + alcohol  $p>0,05$ ). Estos efectos fueron los mismos, independientemente del sexo de las ratas, ya que no se encontró un efecto principal significativo de Sexo ni de la interacción Sexo x Tratamiento.



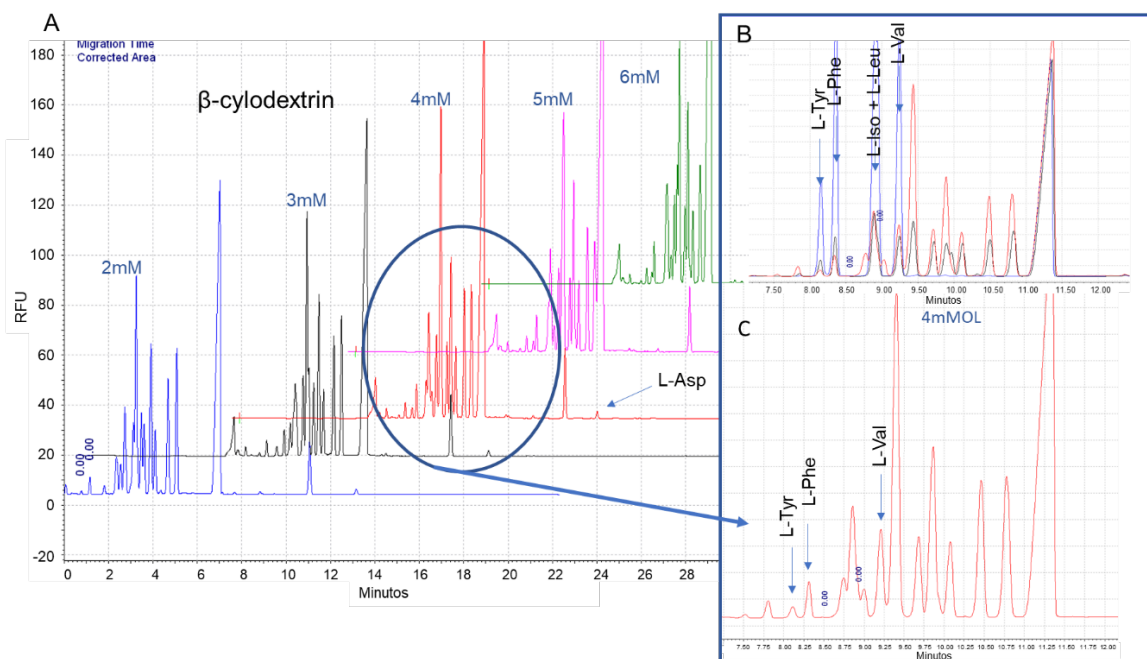
**Figura 35.** Curva del mantenimiento de la conducta de autoadministración. Media ( $\pm$ EEM) de inyecciones por minuto obtenidas para cada tratamiento y día de sesión.

#### 4.3.2. Optimización de las condiciones de análisis de los aminoácidos L-Tyr, L-Phe, L-Val y L-Asp

Las mejores condiciones para la disolución tampón de carrera, empleada para la separación de los picos correspondientes a L-Tyr, L-Phe, L-Val y L-Asp fueron: borato 80 mM a pH 10.25, MeOH al 5% y B-CD 4 mM (Figura 36). La resolución entre picos fue igual o superior a 2. Se empleó una mezcla de 21 aminoácidos [L-lisina (L-Lys), L-metionina (L-Met), L-prolina (L-Pro), L-histidina (L-His), L-arginina (L-Arg), L-asparagina (L-Asn), L-cisteína (L-Cys), L-Iso, L-Leu, L-Orn, L-Gln, L-Ala, L-Tre, Gly, L-Ser, Tau, L-Glu, L-Tyr, L-Phe, L-Val y L-Asp] a una concentración de 100  $\mu$ M como prueba de selectividad. Como se muestra en la Figura 36 C, la matriz de la muestra (plasma) no tiene efecto en la separación de los diferentes aminoácidos, no se observa alteración en la migración, ancho de pico o selectividad.

Las curvas de calibración, obtenidas como la relación de área corregida-AA / área corregida-IS vs concentración-AA, fueron lineales en el rango de concentración probado L-Phe ( $R^2=99,8$ ) y L-Tyr ( $R^2=99,2$ ) entre 30 y 370  $\mu$ M / L, L-Val ( $R^2=99,8$ ) entre 60 y 600  $\mu$ M / L y L-Asp ( $R^2=99,9$ ) entre 3 y 82,4  $\mu$ M / L. El LOD, evaluado como  $S / N = 3$ , fue 0,35  $\mu$ M / L para L-Asp y L-Val, 0,45  $\mu$ M / L para L-L-Phe y 0,7 para L-Tyr,

mientras que LOQ, evaluado como  $S / N = 10$ , fue  $1,1 \mu\text{M} / \text{L}$  para L-Asp y L-Val,  $1,35 \mu\text{M} / \text{L}$  para L-L-Phe y  $2,2$  para L-Tyr.



**Figura 36.** Optimización de la evaluación de L-Tyr, L-Phe, L-Val y L-Asp. (A) Electroferogramas de la optimización de la concentración de  $\beta$ -CD en el tampón de carrera. (B) Detalle de la separación lograda con 4 mM  $\beta$ -CD. (C) Superposición de electroferogramas: rojo, muestra de plasma; negro, mezcla de 21 aminoácidos (100 mM) y azul, L-Tyr, L-Phe, L-Iso, L-Leu y L-Val (0,5 mM).

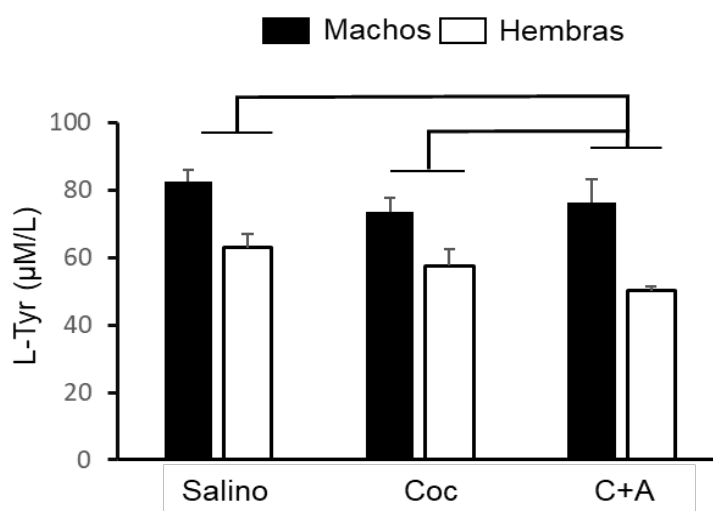
#### 4.3.3. Perfil plasmático de los aminoácidos

Los resultados del análisis estadístico mostraron un efecto principal significativo de sexo en L-Orn ( $F_{1,54}=37,03$ ;  $p<0,001$ ), con una concentración media superior en machos ( $M=86,14$ ;  $DE = 15,47$ ) que en hembras ( $M=64,35$ ;  $DE=11,40$ ); L-Gln ( $F_{1,54}=9,9$ ;  $p<0,01$ ), la media fue mayor en las hembras ( $M=760,93$ ;  $DE=108,29$ ) que en los machos ( $M=685,92$ ;  $DE= 95,02$ ); L-Ala ( $F_{1,54}=23,8$ ;  $p<0,001$ ), con una concentración superior en machos ( $M= 513,88$ ;  $DE=64,04$ ) que en hembras ( $M=440,03$ ;  $DE=47,57$ ); ( $F_{1,54}=17,10$ ;  $p<0,001$ ), la media de los machos fue mayor que la de las hembras ( $M=423,69$ ;  $SD=82,62$  vs.  $M= 339,24$ ;  $DE=65,97$ ); L-Phe ( $F_{1,54}=17,16$ ;  $p<0,001$ ), la media de machos ( $M=69,30$ ;  $DE= 7,49$ ) fue mayor que la de hembras ( $M=61,56$ ;  $DE=6,18$ ); y L-Val ( $F_{1,54}= 9,12$ ;  $p<0,01$ ), con una media en los machos ( $M=220,30$ ;  $DE=23,45$ ) superior a la de hembras ( $M= 202,25$ ;  $DE=22,66$ ; Tabla XXII).

Así mismo, se encontró efecto significativo de *sexo* en el conjunto de aminoácidos aromáticos (AAA; L-Phe y L-Tyr) ( $F_{1,54}= 53,45$ ;  $p<0,001$ ), siendo la concentración de estos metabolitos mayor en machos ( $M=147,15$ ;  $DE=18,57$ ) que en hembras ( $M=117,62$ ;  $DE=12,60$ ). En los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA; L-Leu, L-Val, L-Iso) ( $F_{1,54}= 6,73$ ;  $p<0,05$ ), donde la media fue mayor en machos ( $M= 516,91$ ,  $DE=67,37$ ) que en hembras ( $M=476,83$ ;  $DE=57,03$ ) y en las ratios entre L-Gln y L-Glu (Gln/Glu) ( $F_{1,54}= 12,64$ ;  $p<0,01$ ), donde la media del grupo de hembras ( $M=6,62$ ;  $DE= 1,56$ ) fue superior a la media de la ratio en los machos ( $M=5,37$ ;  $DE=1,03$ ). En la relación entre serina y alanina (Ser/Ala) ( $F_{1,54}= 4,62$ ;  $p<0,05$ ) la ratio en las hembras ( $M=0,70$ ;  $DE=0,1$ ) fue superior a la media de la ratio en los machos ( $M=0,63$ ;  $DE=0,13$ ) y entre serina y glicina (Ser/Gly) ( $F_{1,54}=11,51$ ;  $p<0,01$ ), siendo también la concentración media en las hembras ( $M=0,92$ ;  $DE=0,15$ ) mayor a la de los machos ( $M=0,78$ ;  $DE=0,14$ ).

#### 4.3.3.1. L-Tyr

En cuanto al aminoácido tirosina (L-tyr) se encontró un efecto significativo por el factor *sexo* ( $F_{1,54}= 58,90$ ;  $p<0,001$ ), siendo la media de machos ( $M = 77,84$ ;  $DE=16,76$ ) mayor que la de hembras ( $M=50,06$ ;  $DE=9,71$ ), y un efecto principal de *tratamiento* ( $F_{2,54}= 7,32$ ). El análisis post hoc con el test de *Gabriel* (para muestras ligeramente no equilibradas y asumiendo igualdad de varianzas) arrojó diferencias significativas entre el grupo C+A y SAL ( $p<0,001$ ) y entre C+A y COC ( $p<0,05$ ), con una media inferior en el grupo C+A ( $M=61,11$ ;  $DE=20,29$ ) respecto al grupo con COC ( $M=65,70$ ;  $DE=11,70$ ) y SAL ( $M=72,78$ ;  $DE=15,53$ ). Sin diferencias significativas entre los grupos con tratamiento SAL y COC (ver Fig. 37).



**Figura 37.** Concentraciones plasmáticas de L-Tyr ( $\mu\text{M/L}$ ) según el tratamiento y sexo.

**Tabla XXII. Concentracion ( $\mu\text{M/L}$ ), media  $\pm$  DE, de los catorce AA cuantificados.**

Tabla xx Aminoácidos en plasma ( $\mu\text{mol/L}$ )									
	Salino			COC			C+A		
	Total	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras
<b>L-leu</b>	185.95	207.64	164.25	173.59	179.52	167.66	179.86	175.43	183.03
<b>SD</b>	42.81	50.55	16.38	22.22	19.09	24.76	25.93	19.55	29.99
<b>L-iso</b>	105.57	110.84	100.31	106.71	113.23	100.19	102.48	102.39	102.55
<b>SD</b>	18.21	20.74	14.44	16.03	16.76	13.13	14.11	13.73	14.89
<b>L-orn*</b>	74.33	83.10	65.56	72.68	82.64	62.72	75.89	91.97	64.41
<b>SD</b>	14.38	13.54	9.06	16.94	16.47	10.80	20.05	16.26	13.70
<b>L-gln*</b>	766.83	739.19	794.47	691.84	636.61	747.08	714.56	672.09	744.89
<b>SD</b>	117.27	111.18	122.38	94.50	45.18	100.61	102.35	87.25	104.34
<b>L-ala*</b>	472.93	523.31	422.55	474.48	495.68	453.27	475.82	519.02	444.96
<b>SD</b>	75.53	68.35	41.61	47.20	37.42	48.44	72.36	78.24	50.65
<b>L-treo</b>	330.12	348.77	311.47	291.16	295.30	287.01	313.56	309.17	316.69
<b>SD</b>	70.37	69.72	69.43	54.52	57.54	54.95	62.52	60.89	65.75
<b>Gly*</b>	395.26	448.62	341.91	369.47	378.94	359.99	370.93	434.56	325.49
<b>SD</b>	86.43	81.77	52.51	78.78	72.02	88.93	89.05	84.59	61.13
<b>L-ser</b>	323.65	348.50	298.79	308.44	302.37	314.51	308.78	313.02	305.75
<b>SD</b>	49.06	55.65	24.75	59.23	51.24	69.35	55.00	63.12	50.69
<b>Tau</b>	312.11	340.76	283.46	317.52	247.61	387.43	277.47	263.11	287.73
<b>SD</b>	124.01	153.29	84.52	212.97	63.93	286.24	61.27	74.29	50.50
<b>L-glu</b>	127.51	140.25	114.77	119.20	111.19	127.21	128.00	139.07	120.10
<b>SD</b>	29.50	30.50	23.39	41.35	20.82	55.53	19.89	14.84	19.64
<b>L-tyr*#</b>	72.78	82.59	62.98	65.70	73.75	57.65	61.11	76.37	50.22
<b>SD</b>	15.53	11.48	12.78	11.70	11.01	4.91	20.29	23.97	4.84
<b>L-phe*</b>	65.66	68.47	62.86	64.51	67.72	61.30	65.21	71.41	60.79
<b>SD</b>	7.85	9.04	5.55	6.80	7.33	4.69	8.63	6.06	7.47
<b>L-val*</b>	210.06	219.19	200.93	210.91	222.99	198.84	211.03	219.27	205.15
<b>SD</b>	25.80	25.17	24.22	25.27	25.25	19.94	24.13	22.61	24.22
<b>L-asp</b>	24.82	27.77	21.88	24.96	19.84	30.08	22.56	24.03	21.51
<b>SD</b>	10.96	13.66	6.91	14.96	4.81	19.91	6.59	6.15	6.91
Diferencias significativas por: * sex, # Treatment									

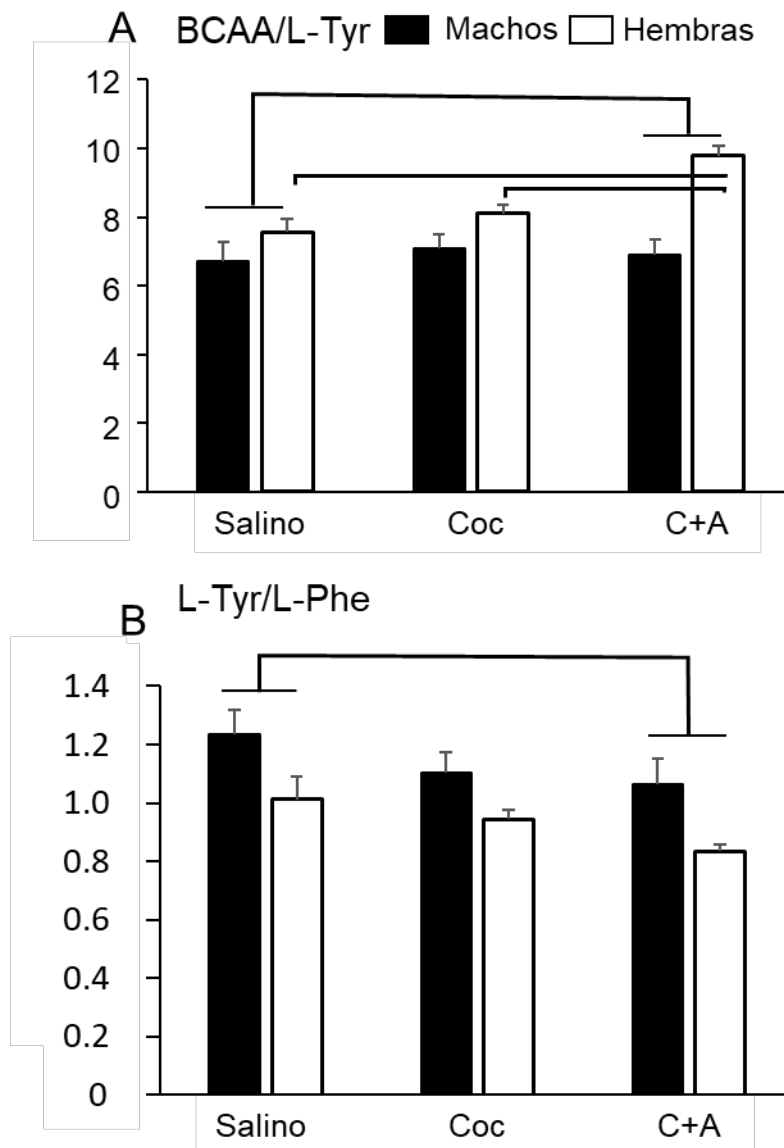
#### 4.3.3.2. Ratio Tyr/Phe

Respecto a la ratio entre L-Tyr y L-Phe (Tyr/Phe) los análisis mostraron un efecto principal significativo del sexo ( $F_{1,54}=16,56$ ;  $p<0,001$ ), con una media mayor en machos que en hembras ( $M=1,14$ ;  $DE=0,07$  vs.  $M=0,92$ ;  $DE=0,17$ ) y un efecto significativo del tratamiento ( $F_{2,54}=4,97$ ;  $p<0,05$ ). En el *post hoc* las diferencias entre el control Salino y los grupos de tratamiento con las drogas se centraron en el grupo C+A

( $p<0,01$ ), sin diferencias entre COC vs Sal y COC vs C+A. La ratio más elevada correspondió al grupo C+A ( $M=1,12$ ;  $DE=0,19$ ) (Ver Tabla XXIII y Figura 38). En los contrastes planificados a priori (método Helmet) se encontraron diferencias significativas en la ratio L-Tyr/L-Phe entre el grupo SAL y los grupos COC y C+A tomados en conjunto ( $p<0,05$ ), sin diferencias significativas entre los grupos COC y C+A.

#### 4.3.3.3 Ratio BCAA/Tyr

Finalmente, los resultados arrojaron diferencias significativas en la ratio de AA de cadena ramificada respecto a L-Tyr (BCAA/Tyr) en el factor *sexo* ( $F_{1,54} = 21,68$ ;  $p<0,001$ ), con una media en las hembras ( $M = 8,67$ ;  $DE=1,44$ ) mayor que la de los machos ( $M = 6,88$ ;  $DE=1,49$ ). A su vez, se encontró un efecto del tratamiento ( $F_{2,54} = 4,80$ ;  $p<0,05$ ), que en el *post hoc* reflejó una ratio superior en el grupo C+A comparado con el grupo con el control Salino ( $p<0,01$ ), sin diferencias estadísticamente significativas entre C+A y COC ni entre COC y Salino (Tabla XXIII). También se observa una interacción significativa de *sexo x tratamiento* ( $F_{2,54} = 4,11$ ;  $p<0,05$ ). En las comparaciones de medias por parejas para el estudio de los efectos simples (corrección de Bonferroni) se encontraron diferencias significativas entre los distintos niveles de la variable *tratamiento* en el grupo de las hembras ( $F_{2,54} = 9,60$ ;  $p<0,001$ ). En concreto, las diferencias fueron significativas entre el grupo C+A y SAL ( $p<0,001$ ) y entre C+A y COC ( $p<0,05$ ), sin diferencias significativas entre COC y Salino. El valor medio de la ratio BCCA/Tyr en las ratas hembras se vio aumentado en las que recibieron C+A con respecto a las que recibieron tratamiento solo con COC y al control Salino (Tabla X). En el grupo de los machos, sin embargo, no hubo diferencias significativas en la ratio a través de los distintos tratamientos. Para cada nivel del factor *sexo* se encontró un efecto simple significativo ente machos y hembras que recibieron tratamiento con C+A ( $F_{1,54}=28,14$ ;  $p<0,001$ ). Sin efectos simples para machos y hembras con COC y SAL.



**Figura 38.** Ratios BCAA/L-Tyr y L-Tyr/L-Phe segregados por sexo y tratamientos.

	Saline			COC			C+A		
	Total	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras
<b>SUM AA</b>	<b>3467.58</b>	<b>3688.99</b>	<b>3246.17</b>	<b>3291.17</b>	<b>3227.40</b>	<b>3354.93</b>	<b>3307.26</b>	<b>3410.89</b>	<b>3233.24</b>
SD	461.47	507.44	288.33	470.51	301.93	611.50	327.85	340.06	309.75
<b>AAA*</b>	<b>138.44</b>	<b>151.06</b>	<b>125.83</b>	<b>130.21</b>	<b>141.47</b>	<b>118.95</b>	<b>126.33</b>	<b>147.78</b>	<b>111.00</b>
SD	17.73	11.63	13.22	15.49	12.79	7.80	26.41	26.94	11.17
<b>BCAA*</b>	<b>501.58</b>	<b>537.66</b>	<b>465.49</b>	<b>491.21</b>	<b>515.74</b>	<b>466.68</b>	<b>493.37</b>	<b>497.09</b>	<b>490.72</b>
SD	79.89	88.96	51.64	60.12	58.97	53.77	55.46	45.60	63.11
<b>BCAA/Tyr&amp;##</b>	<b>7.13</b>	<b>6.70</b>	<b>7.57</b>	<b>7.60</b>	<b>7.10</b>	<b>8.10</b>	<b>8.58</b>	<b>6.89</b>	<b>9.79</b>
SD	1.53	1.77	1.17	1.05	1.12	0.73	1.95	1.57	1.11
<b>Tyr/Phe&amp;*</b>	<b>1.12</b>	<b>1.23</b>	<b>1.01</b>	<b>1.02</b>	<b>1.10</b>	<b>0.94</b>	<b>0.93</b>	<b>1.07</b>	<b>0.83</b>
SD	0.28	0.28	0.25	0.17	0.21	0.09	0.23	0.30	0.09
<b>Gln/Glu*</b>	<b>6.28</b>	<b>5.47</b>	<b>7.10</b>	<b>6.18</b>	<b>5.86</b>	<b>6.50</b>	<b>5.73</b>	<b>4.87</b>	<b>6.35</b>
SD	1.56	1.25	1.43	1.56	0.88	2.05	1.35	0.73	1.37
<b>Ser/Ala*</b>	<b>0.69</b>	<b>0.68</b>	<b>0.71</b>	<b>0.65</b>	<b>0.61</b>	<b>0.69</b>	<b>0.66</b>	<b>0.61</b>	<b>0.69</b>
SD	0.11	0.15	0.05	0.12	0.10	0.13	0.13	0.13	0.11
<b>Ser/Gly*</b>	<b>0.84</b>	<b>0.79</b>	<b>0.89</b>	<b>0.85</b>	<b>0.81</b>	<b>0.89</b>	<b>0.86</b>	<b>0.74</b>	<b>0.96</b>
SD	0.13	0.13	0.12	0.15	0.12	0.18	0.20	0.18	0.16
<b>&amp; treatment significant effect. * sex differences. # sex-treatment interaction</b>									
<b>SUM AA: sum of amino acids; AAA: aromatic amino acids (Tyr+Phe); BCAA: branched aminoacids (Val+Iso+Leu)</b>									

**Tabla XXIII:** Ratios estudiados entre los aminoácidos cuantificados.







## 5. Discusión





### 5.1. Discusión de los resultados del Estudio I

En este primer estudio se analizaron los efectos originados por la administración crónica por vía intravenosa de cocaína, alcohol y de la combinación de ambas sustancias sobre los niveles plasmáticos de nueve aminoácidos en ratas adultas Wistar. La administración se realizó en cajas de condicionamiento operante con un sistema automatizado que simulaba, mediante infusiones pautadas, algunos de los parámetros presentes en los modelos animales de autoadministración de drogas psicoactivas. Esos parámetros fueron, libertad de movimientos, dosis con capacidad reforzante suficiente para cada inyección y distribución temporal de las infusiones. Así, el dispositivo implantado en la espalda de los animales (sistema infusión unido a un "swivel" o pivote giratorio) acoplado las cajas de condicionamiento operante permitió que las ratas se movieran con libertad durante la recepción de los tratamientos evitando un estrés innecesario. La dosis empleada por infusión de 0,5 mg/kg p.v. cuenta con capacidad suficiente como reforzador para ser autoadministrada por ratas en modelos de autoadministración intravenosa (Pickens y Thompson, 1968). Por su parte, la administración intravenosa, mantenida durante 105 minutos y con 30 infusiones de cocaína (0,5mg/kg p.v. /inyección), alcohol (66mg/kg p.v./inyección) o cocaína+alcohol (0,5mg/kg p.v./inyección + 66 mg/kg p.v./inyección) y durante 21 días, con el propósito de imitar las condiciones experimentales de estudios previos de nuestro grupo, permitió demostrar que los animales no sufrieron efectos toxicológicos apreciables observables externamente y por su conducta abierta. En consecuencia, esta nuestra primera aproximación experimental a la administración conjunta de alcohol y cocaína por vía intravenosa fue considerada apta para proceder al análisis de los niveles de aminoácidos en plasma de los animales.

#### Niveles plasmáticos de alcohol y aminoácidos

##### Alcohol

Los niveles de alcohol en plasma fueron un 12% superiores en el grupo cocaína y alcohol (C+A) respecto al grupo que solamente recibió alcohol, grupo Alc, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En otros trabajos se comprobado que la cocaína inhalada, 15 minutos después de terminar de consumir alcohol, parece que no altera los niveles de etanol en sangre (Perez-Reyes y Jeffcoat, 1992). No obstante, otros autores sí han encontrado pequeñas diferencias en el mismo sentido que las encontradas en este trabajo, las cuales sugieren que hay interacciones enzimáticas entre ambas sustancias. Por otro lado, la inhibición por el alcohol del

metabolismo de la cocaína hacia sus metabolitos benzoilecgonina y ecgonina metil éster si está ampliamente demostrada (Roberts et al 1993).

### **L-alanina y L-aspartato**

En nuestro estudio los niveles de L-alanina se encontraron disminuidos en los animales expuestos tanto a alcohol como a cocaína. En el caso del alcohol, el hecho de que los niveles de la L-alanina fueran significativamente menores es algo bien contrastado por la literatura científica. Una posible explicación de la disminución de los niveles de ese aminoácido puede ser debida a la rápida desaminación a piruvato que tiene lugar en el hígado. Así, Felig *et al.*, (1970) demostraron que la disminución de la alanina plasmática tras el consumo de alcohol, igual que el de otros aminoácidos, podía compensarse parcialmente mediante la administración del inhibidor de la oxidación del alcohol, pirazol 4-metilpirazol. Por tanto, es posible que la disminución que hemos encontrado de L-alanina se haya podido deber a una mayor actividad de la vía oxidativa del alcohol. A este respecto, se ha comprobado que durante la oxidación del alcohol por procesos relacionados con la formación de NADH y de la proporción lactaro/piruvato se produce un aumento de la desaminación de L-alanina hacia piruvato (Li y Iheorell, 1969). En apoyo de esta posibilidad se ha observado que aportando L-alanina extra a ratones mediante una inyección intraperitoneal de 300 mg/kg de ese aminoácido, una hora antes de la administración intragástrica de 2 gr/kg p.v. de alcohol, redujo los niveles de acetato y de acetona en la sangre, al tiempo que supuso un aumento significativo de ácido pirúvico disponible para la generación de NAD (Tsukamoto *et al.*, 1990). Estos resultados sugieren que la cantidad de piruvato que se forma es, en gran medida, a expensas la L-alanina.

La cocaína también redujo los valores de L-alanina, y aunque un pequeño porcentaje de su metabolización sufre una vía oxidativa, a través de una ruta metabólica que se inicia con la norcocaína, probablemente este descenso tenga un origen distinto al del alcohol.

En este trabajo hemos observado que la concentración de L-Asp en los grupos de ratas no expuestas al alcohol fue significativamente mayor que las cuantificadas para los que sí tuvieron alcohol en su tratamiento, grupos Alc y C+A. Hagman y Eriksson (1991), estudiando las alteraciones de AA en plasma originadas por el alcohol, encontraron con la misma dosis, aunque con diferencias experimentales, una depleción similar de este aminoácido. El aspartato no tiene un papel tan importante como la alanina en la gluconeogénesis, por lo que se requiere una explicación

alternativa a la vía oxidativa. Eriksson, *et al.* (1981) propusieron que tanto los mecanismos adrenérgicos, como los esteroides de la corteza suprarrenal pueden participar en el agotamiento de los aminoácidos ante la presencia de alcohol. Estos autores encontraron que esta reducción de AA plasmáticos, aspartato y alanina incluidos, se compensó parcialmente a través de un antagonista adrenérgico, el propranolol. Por otro lado, la hipofisectomía y la adrenalectomía también compensaron parcialmente la caída de estos AA, lo que apoya la hipótesis de estos autores.

### **Ratio Tyr/Phe**

El análisis estadístico reveló que la exposición al alcohol tuvo un efecto opuesto al de la cocaína respecto a la ratio L-Tyr/L-Phe, no encontrándose interacciones entre ambos factores. En un estudio realizado en voluntarios con dependencia de cocaína, Tennant (1985) observó una reducción del 20% en la concentración de tirosina en individuos dependientes de cocaína en relación con el grupo de control. En este mismo estudio se encontró que la proporción Tyr/Phe tenía un valor esperado más bajo de lo normal en varios de los usuarios voluntarios de cocaína.

La fenilalanina y la tirosina son precursores de las catecolaminas (dopamina, norepinefrina y epinefrina). La fenilalanina es un AA esencial y su conversión en tirosina por la fenilalanina hidroxilasa puede no ser suficiente para satisfacer las necesidades que tienen las neuronas dopaminérgicas afectadas por los inhibidores de la recaptación de catecolaminas, como la cocaína (Ikeda, *et al.*, 1965). Esta falta de tirosina se puede compensar con la provisión del torrente sanguíneo. El triptófano y la tirosina compiten entre sí y con AA neutros de cadena larga (LNAA: fenilalanina, leucina, valina, isoleucina, treonina y metionina) por los sistemas de transporte de la barrera hematoencefálica y de membrana (Wurtman, 1981). Una explicación inicial de cómo la cocaína puede influir en los niveles bajos en las concentraciones de tirosina en plasma, y por lo tanto en la relación L-Tyr/L-Phe, es que las neuronas intentan acelerar su reclutamiento para corregir su deficiencia (Wurtman, *et al.*, 1981 ).

La administración oral de una mezcla de aminoácidos que carece de tirosina y fenilalanina induce, en ratas, un profundo agotamiento de la tirosina en suero y en el cerebro (Biggio, *et al.*, 1996). Una estrategia utilizada con frecuencia para determinar la relación entre la disponibilidad de precursores de catecolaminas y múltiples patologías son los estudios de agotamiento de monoaminas. El agotamiento agudo de fenilalanina/tirosina (o en sus siglas inglesas, APTD) consiste en suministrar una mezcla

de AA sin fenilalanina ni tirosina. Por medio de APTD, la tirosina cerebral se reduce tanto por una caída en la tirosina del plasma como por la competencia con los aminoácidos neutros de cadena larga por los transportadores de membrana. Otra estrategia ha sido reducir la síntesis de L-dopa mediante el uso de un inhibidor de alfa-metil-p-tirosina (AMPT) (Booij *et al.*, 2003). El resultado tanto de APTD como de AMPT es una disminución transitoria en la síntesis de catecolaminas. Utilizando la metodología APTD, Palmour *et al.*, (1998) observaron una reducción de los metabolitos de catecolaminas en el líquido cefalorraquídeo y el deseo por el alcohol en monos. Esto último no se ha confirmado en humanos (Leyton *et al.*, 2000). Con respecto a la cocaína, McTavish *et al.*, (2001) confirmaron que, en ratas, una mezcla de aminoácidos libres de tirosina atenúa la activación del comportamiento inducido por cocaína y anfetaminas. Los hallazgos de estos autores se complementan con un estudio en humanos donde la reducción de catecolaminas a través de AMPT induce una tendencia hacia una "subida" más suave después de la administración intranasal de cocaína (Stine, *et al.*, 1997). También se observó que el AMPT, en comparación con el placebo, redujo los niveles plasmáticos de los metabolitos de la dopamina, ácido homovanílico, y de la norepinefrina, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol.



## 5.2. Discusión del Estudio II

### Sistema GABAérgico

Como sabemos, la gefirina es una proteína de andamiaje presente en la membrana postsináptica neuronal, responsable de la agrupación y localización de los receptores de glicina y GABA en las sinapsis inhibitorias. La gefirina es abundante en el cerebro, principalmente en el sistema GABAérgico, por lo que se ha propuesto como un indicador de la función inhibitoria en el SNC y se ha estudiado su posible efecto en presencia de drogas de abuso, especialmente del alcohol, dada su relación con el sistema GABAérgico. En el hipocampo, en el presente trabajo hemos encontrado unos valores de gefirina inferiores, respecto a los del grupo salino, en los grupos con exposición al alcohol (grupos Alc y C+A). En esta misma región, de los cuatro genes de subunidades GABA<sub>A</sub> que hemos estudiado, solamente se encontraron diferencias significativas en la expresión de la subunidad delta (*Gabrd*). En concreto, encontramos que la expresión de este gen estaba disminuida en el grupo Coc respecto a los grupos salino y alcohol. Que sepamos, en la literatura científica solamente hemos encontrado un trabajo donde se estudie de manera exhaustiva la expresión de genes relacionados con los receptores GABAérgicos tras la exposición a cocaína y alcohol. En concreto, se trata del trabajo de Enoch *et al.*, (2012) en el que emplearon hipocampos procedentes de humanos, así como un modelo animal complementario. Primeramente, realizaron un estudio en ese tejido cerebral, obtenido *post mortem* de cocainómanos y alcohólicos, así como de sujetos controles, de la expresión de genes relacionados con el sistema GABAérgico. Esos autores encontraron que los hipocampos de las personas que eran dependientes de la cocaína mostraban una disminución en la expresión del gen que codifica la gefirina (*Gphn*) respecto a los procedentes de los alcohólicos y de los sujetos controles, pero sin diferencias entre los sujetos dependientes del alcohol y los controles. Respecto a la expresión de subunidades de receptores, encontraron que la expresión de la subunidad  $\alpha 2$  de GABA<sub>A</sub> en el hipocampo se mostró alterada tanto en alcohólicos, como en adictos a la cocaína (Enoch *et al.*, 2012). En lo que se refiere a los resultados obtenidos en el modelo animal, los citados autores compararon ratas, sin ser expuestas al alcohol, de cepas con y sin preferencia por el alcohol (P vs NP rats), en las que encontraron que el gen *Gphn* estaba sobrerregulado en las ratas P. En este grupo de *P-rats* también se apreció una sobrerregulación en el gen correspondiente a los receptores *Gabrg2* de GABA<sub>A</sub> en comparación con las ratas NP (Enoch *et al.*, 2012). A la vista de los datos obtenidos por nosotros en el hipocampo y por el grupo de Enoch *et al.* (2012) es claro

que no van en la misma línea. Así, en el estudio que estos autores realizaron en humanos encontraron que la expresión de gefirina disminuía en el grupo de los expuestos a cocaína, mientras que en nuestro caso esa disminución se daba en los grupos expuestos a alcohol. Por su parte, en el estudio de esos autores referido a animales de cepas seleccionadas genéticamente por su preferencia por el alcohol, ellos encontraron un aumento en la expresión de gefirina en los animales P, pero estos animales no habían sido expuestos al alcohol, con lo que puede pensarse que es una diferencia basal de las cepas de ratas P y NP. En nuestro caso, observamos que se producía una disminución de la expresión de gefirina en los animales expuestos a alcohol, bien solo o en combinación con la cocaína. La no concordancia de nuestros resultados y los de Enoch *et al.* (2012) podría explicarse por diferencias entre especies y por la exposición o no a alcohol. En nuestro estudio, además, la exposición a las drogas se hizo de manera crónica e intravenosa durante un tiempo de 21 días seguidos.

Por otra parte, a diferencia del trabajo de Enoch *et al.*, (2012), en el nuestro hemos estudiado otras regiones cerebrales, además de hipocampo. A este respecto, ha sido en la CPFm donde hemos observado mayores diferencias en la expresión de receptores GABAérgicos. En esta región, tanto el alcohol, como la cocaína o su combinación, indujeron una acusada caída en la expresión de *Gabrg2*. Cabe reseñar que la gefirina se ha asociado con la subunidad  $\gamma 2$  (*Gabrg2*) y que esta asociación parece contribuir a la incorporación de la gefirina necesaria para la agrupación sináptica de otras subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> (Aldred *et al.*, 2005). Además de los hallazgos referidos a *Gabrg2*, las subunidades *Gabra2* y *Gabrd* también mostraron diferencias en la CPFm por efecto de la cocaína, del alcohol o de su combinación. En el caso de la subunidad *Gabra2*, igualmente observamos que su expresión se mostraba alterada en la amígdala, donde los dos grupos con alcohol, Alc y A+C, tuvieron valores significativamente inferiores a los del grupo salino. Por último, indicar que en el NAc, aunque no hemos encontrado ningún hallazgo en la expresión de las subunidades de receptores GABA<sub>A</sub>, sí hemos apreciado diferencias entre tratamientos en la proteína gefirina. En concreto, observamos una disminución significativa en los valores de esta proteína en el grupo alcohol respecto a los grupos salino y cocaína. Aunque no tengamos en la literatura científica otros estudios, referidos a estructuras cerebrales distintas del hipocampo, que posibilitaran contrastar nuestros resultados con los de otros autores, nuestro trabajo sugiere que el consumo de alcohol y cocaína altera la expresión de genes que codifican diversas subunidades del receptor GABA.

### Sistema glutamatérgico

El sistema glutamatérgico, en general, participa en el desarrollo de la dependencia a drogas. Los receptores de glutamato NMDA desempeñan un papel importante en la plasticidad sináptica, el desarrollo neural y la muerte de las células neuronales excitotóxicas. Tanto la ATV como el NAc reciben importantes aferencias glutamatérgicas.

La proteína de anclaje de receptores de NMDA, PSD-95, se ha asociado con la plasticidad glutamatérgica tras la exposición a drogas de abuso. En este trabajo no se ha encontrado que los tratamientos alterasen la PSD-95 en las regiones estudiadas. Yao *et al.*, (2004) intentaron explorar si la cocaína promueve una desregulación en la expresión de PSD-95 en corteza, hipocampo y cuerpo estriado. No encontraron alteraciones en hipocampo ni en corteza, pero sí en el cuerpo estriado, donde la expresión del ARNm estaba especialmente disminuida. Este decrecimiento se observaba en todo el cuerpo estriado, pero especialmente en caudado putamen y NAc.

Respecto a los tres subtipos de receptores aquí valorados de NMDA, *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2B*, solamente se encontraron diferencias en *Grin1* en CPFm y NAc. En los dos casos los tratamientos con alcohol, cocaína o su combinación disminuyeron la expresión de este receptor en estas dos regiones, tomando el salino como referencia. Ya se conoce que el alcohol induce cambios en la expresión de genes de subunidades de receptores de NMDA (Xiang *et al.*, 2015). Estos autores obtuvieron un efecto opuesto al aquí descrito, con una sobreexpresión de estos genes por la exposición al alcohol. No obstante, hay diferencias en los procedimientos utilizados. Dado que estos investigadores emplearon neuronas corticales derivadas de células madre embrionarias humanas como modelo celular in vitro, mientras que nosotros hemos utilizado un modelo animal in vivo en ratas de laboratorio. Tampoco son comparables los tiempos de exposición, 7 días para Xiang *et al.* (2015) y 21 días para el trabajo aquí presentado.

En modelos animales se ha encontrado que, tanto la exposición aguda como la crónica al alcohol, afectan a la expresión de los receptores NMDA. En monos que se autoadministraron alcohol, la variante del receptor de NMDAR1, *Grin1-1*, se encontró reducida en la corteza orbitofrontal, mientras que la variante *Grin1-2* aumentó (Acosta *et al.*, 2010). En otras áreas corticales (corteza prefrontal dorsolateral y corteza cingulada) estos autores no encontraron cambios. Estos hallazgos son un indicador de que la expresión en la corteza prefrontal de los genes de receptores NMDAR1

mantiene patrones diferentes según las distintas áreas de la corteza prefrontal y los distintos subtipos de receptor *Grin1*. En nuestro estudio, sin diferenciar los subtipos, observamos que en la CPFm los valores de los grupos con cocaína y/o alcohol mostraron una disminución de la expresión, respecto al grupo salino, tal como Acosta *et al.*, (2010) describieron en corteza orbitofrontal y en corteza dorsolateral para *Grin1-1*. Curiosamente, nosotros hemos encontrado un mismo patrón en el NAc, lo cual podría indicar el tipo de cambios que pueden producirse en la plasticidad de esa vía mesocorticolímbica.

En los trabajos para analizar cómo influye sobre el sistema glutamatérgico la exposición crónica a alcohol, se ha dado un papel más destacado a los receptores NMDA, respecto a los de AMPA (Chandler *et al.*, 1999, Nagy *et al.*, 2005), aunque también éstos se ven alterados. En el NAc es donde hemos encontrado una expresión disminuida para el receptor *Gria2* con un patrón similar a *Grin1*, de modo que los tres tratamientos redujeron su expresión. Al igual que en los receptores NMDA, esta expresión reducida por alcohol, cocaína o su combinación no apoya algunos de los resultados conocidos que indican lo contrario, esto es, una sobreexpresión de subunidades de los receptores AMPA (Chandler *et al.*, 1999). Estos hallazgos fueron obtenidos por medio de cultivos celulares, por lo que si los comparamos con los encontrados en nuestro modelo animal, puede haber diferencias en las condiciones experimentales deben de ser tenidas en cuenta.

### **Sistema endocannabinoide**

Numerosos trabajos apoyan que los receptores CB1 y sus ligandos están involucrados en la regulación dopaminérgica de la vía de la recompensa mesocorticolímbica. El gen del receptor CB1 (*Cnr1*) ha sido objeto de estudio como partícipe en la vulnerabilidad de la adicción a cocaína. Algunas variantes del *Cnr1* se han asociado a una mayor dependencia a las drogas en general y a la cocaína en particular (Zuo, *et al.*, 2007). Respecto a los valores *Cnr1*, nosotros hemos encontrado diferencias en la CPFm y la amígdala con un patrón opuesto entre ambas regiones. En la CPFm, el alcohol y la cocaína parecen sobrerregular la expresión de este gen, mientras que, en la amígdala, el alcohol parece disminuir su expresión. A este respecto, los datos obtenidos por González *et al.*, (2002) indican que en ratas expuestas a cocaína se producen cambios significativos en la expresión del ARNm del receptor CB1, pero no en el caso del alcohol. Parcialmente en contradicción con nuestro estudio, comprobaron que una exposición crónica a cocaína produce una

disminución en los niveles de transcripción en el núcleo hipotalámico ventromedial y en distintas áreas de la corteza cerebral, sin apreciar alteraciones en estructuras del hipocampo, corteza motora o el sistema límbico. Estos cambios observados en la expresión de ARNm no tuvieron reflejo en la cuantificación de receptores de CB1 medida por autorradiografía en dichas regiones. Esta aparente contradicción es atribuida a que la cocaína podría afectar solamente a la transcripción, pero no a la transmisión endocannabinoide basal. Respecto al alcohol, estos autores no encontraron que su exposición crónica afectase a la expresión del ARNm ni a la hibridación del radioligando empleado con los receptores CB1. Como indicamos anteriormente, en nuestro trabajo si hemos encontrado efectos de la exposición crónica al alcohol sobre la expresión de *Cnr1* en CPF y amígdala, pero no contamos con la distribución anatómica de receptores que aporta la técnica de autorradiografía cuantitativa para su comparación.

Los valores de expresión de los genes que codifican las enzimas *Faah* y *Mgll* apoyan parcialmente nuestros datos anteriores sobre *Cnr1*, pues en la CPFm la enzima *Mgll* sufrió cambios según el tratamiento en el mismo sentido a como lo hizo el receptor CB1. Mientras que la expresión de *Dagla*, enzima que sintetiza ligandos cannabinoides se ve reducida por el alcohol y por la cocaína en la amígdala. La variabilidad genética de la *Faah* y de otras enzimas relacionadas con ligandos endocannabinoides se ha relacionado con la vulnerabilidad individual ante problemas con el alcohol (Bühler *et al.*, 2014). Un ejemplo de esto es que en líneas genéticas de ratas, seleccionadas para ser muy consumidoras de alcohol, Alko-alcohol, se ha comprobado que hay un déficit de expresión de *Faah* en CPF y una menor actividad de esta enzima (Hansson *et al.*, 2007). Del trabajo anterior se deduce que la CPF tiene una función destacada en cuanto a la transmisión endocannabinoide y alcoholismo, con un papel de las enzimas *Faah* y *Mgll*. El fenotipo de estas ratas Alko-alcohol se caracterizó por una transmisión endocannabinoide hiperactiva y parcialmente desensibilizada en la CPF. Estas dos características contribuyen a su alto consumo de alcohol. En ratas Wistar es posible aproximarse al modelo anterior mediante la inactivación de la *Faah* (Hansson *et al.*, 2007).

### **Perfil plasmático de metabolitos de la cocaína**

En las Tablas XVI y XVII ya se presentaron los datos referidos al perfil plasmático de metabolitos de la cocaína. Estos valores nos indican la detección de diferentes productos del metabolismo de esa droga en el plasma de los animales. Los valores

representados en la Figura 29 son de carácter semicuantitativo, ya que indican los valores de abundancia relativa sin estar referidos a un patrón. No obstante, nos permiten estimar el cambio producido en función de los distintos tratamientos. A este respecto, la suma de benzoilecgonina y norcocaína aparece reducida en las ratas que recibieron C+A respecto a las Coc. Esto es lo esperable, puesto que el alcohol modifica la biotransformación de la cocaína en este sentido (Pan y Hedaya, 1999). La presencia del alcohol induce una inhibición de la vía hidrolítica, con una menor generación de benzoilecgonina que, en parte, es transformada en cocaetileno (Dean et al., 1995). Aunque también hay una potenciación de la vía oxidativa, con una mayor generación de norcocaína, esta no compensaría a la anterior y, por tanto, el resultado esperado es que la suma de estos metabolitos esté reducida en los sujetos del grupo C+A. A este respecto, Bojack-Mckay *et al.* (2000) observaron que las concentraciones de benzoilecgonina son más bajas cuando está presente el cocaetileno, por lo que sugirieron que sería la misma enzima la responsable de la formación de ambos metabolitos.

La aparición del metabolito cocaetileno, únicamente en los sujetos que han recibido alcohol junto con cocaína (Figura 29), está dentro lo esperable. Este metabolito no aparece en los otros grupos y, por tanto, podemos pensar que no se han producido errores experimentales graves durante el procedimiento seguido.

No se aprecian diferencias importantes entre los grupos cocaína y cocaína+alcohol para el metabolito Ecgonina metil éster. Aparecen los metabolitos anhidroecgonina (ecgonidina) con un valor significativamente más elevado en el grupo cocaína y anhidroecgonina metilester (ecgonidina metil éster), aunque este último no muestra diferencias entre grupos (Figura 29). Estos dos metabolitos hasta ahora siempre se han relacionado con la cocaína base fumada (Tamborelli Garcia *et al.*, 2012). Por tanto, su presencia debe deberse a alguna variable de la técnica analítica (LC-MS). La elevada temperatura que alcanza la muestra en el proceso de análisis, en concreto en la nebulización del gas por el electrospray, pudo reproducir el proceso de pirólisis similar al de la cocaína base fumada.

## **Aminoácidos en plasma**

### **Análisis univariado factorial**

Los niveles de cuatro AA fueron alterados de forma significativa tras la exposición a cocaína, L-Iso, L-Leu, L-Glu y L-Ser. Las ratas expuestas a esta sustancia

tuvieron concentraciones más elevadas para esos cuatro AA respecto a las que recibieron otros tratamientos. Es interesante observar que L-Iso y L-Ser también se mostraron afectados por la interacción cocaína y alcohol. En concreto, la L-serina parece que muestra un valor más bajo cuando concurren ambas drogas, respecto a la presencia única de cocaína. Se han encontrado niveles altos de serina en pacientes con trastornos psicóticos como esquizofrenia, depresión, epilepsia o trastorno bipolar. (Altamura et al, 1995; Huxtable *et al.*, 1983; Mauri et al, 1998; Zavala, *et al.*, 2001). La L-serina es un aminoácido que se cataliza a partir de otros aminoácidos neuroactivos como la glicina o la taurina y podría verse afectada por cambios en estos aminoácidos. El glutamato es el principal aminoácido excitatorio en el SNC, pudiendo ser utilizado hasta en un 40% de las sinapsis. Se conoce que los niveles elevados de glutamato libre en plasma se han asociado a un mayor riesgo de sufrir depresión (Mayoral Mariles, 2012) y, como sabemos, la depresión es una de las diversas patologías psiquiátricas relacionadas con el consumo de cocaína, siendo frecuente la comorbilidad psiquiátrica (Weiss et al 1989).

Isoleucina y Leucina son dos aminoácidos neutros de cadena larga que compiten por los sistemas de transporte con los aminoácidos aromáticos, tirosina, fenilalanina y triptófano para atravesar la barrera hematoencefálica (Wurtman, 1981). La demanda de tirosina como precursor en la ruta metabólica de las catecolaminas podría afectar al desequilibrio entre estos dos tipos de aminoácidos.

### **Efectos de la sola administración de alcohol**

De las diversas desregularizaciones metabólicas que sufren los consumidores patológicos de alcohol, una de ellas es en el patrón de aminoácidos plasmáticos (Siegel, *et al.*, 1964). Los AA plasmáticos en alcoholismo, al contrario de la cocaína, sí han sido ampliamente estudiados. Se conoce que la exposición aguda a alcohol induce una importante caída en la concentración de alanina en plasma y, que si ésta viene precedida de un consumo prolongado en el tiempo, este descenso es significativamente menor (Hagman y Eriksson, 1991).

La exposición a solamente alcohol tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de cuatro aminoácidos (L-Ala, L-Gln, L-Orn y L-Ser). En la discusión del Estudio I ya se indicó que la alanina tiene un papel importante en la gluconeogénesis y sufre una rápida desaminación a piruvato en el hígado (Felig *et al.*, 1970). Hagman y Eriksson (1991) observaron en ratas que la administración crónica de alcohol generó una depleción, además de en la alanina, en otros cinco aminoácidos (metionina,

leucina, lisina, triptófano y arginina). En nuestro estudio no se cuantificaron la lisina, arginina ni el triptófano y, respecto a la leucina, no hemos encontrado lo que refieren los autores indicados. Aunque este trabajo y el de Hagman y Eriksson, 1991 emplearon la misma dosis de alcohol (2g/kg p.v.), la comparación no es del todo plausible por existir diferencias experimentales tales como que en nuestro estudio se ha empleado la cepa Wistar y se han administrado los tratamientos por vía intravenosa mediante 30 infusiones distribuidas en 105 minutos, mientras que Hagman y Eriksson (1991) emplearon ratas Sprague-Dawley y una única inyección intraperitoneal.

Observamos, por otro lado, que el alcohol aumentó la concentración plasmática de L-Gln. Este aminoácido ha sido relacionado con algunos aspectos del alcoholismo. Por ejemplo, en voluntarios el consumo de alcohol se reduce mediante la administración de L-Gln (Siegel *et al.*, 1964). A su vez, la concentración de L-Ser también se encontró alterada con un efecto de bajada, opuesto al del grupo de cocaína, que se refleja en la interacción entre estos dos tratamientos considerados como factores en el análisis estadístico realizado.

### **Efecto de la edad y del sexo**

El estudio de las interacciones entre edad y sexo como variables que pueden modular los cambios en los efectos que la cocaína y el alcohol pudieran tener sobre el perfil de los aminoácidos plasmáticos es de especial interés.

Tres aminoácidos mostraron diferencias significativas en función de la edad, L-Iso, L-Leu y L-Gln. En la población general, según se avanza hacia la edad adulta, el contenido plasmático de aminoácidos va aumentando. Estos aumentos se atribuyen al crecimiento de la masa muscular. Esto concuerda con los valores de L-Gln que observamos, los cuales fueron significativamente más altos en los adultos (772  $\mu\text{M/L}$ ) respecto a los jóvenes (732  $\mu\text{M/L}$ ). El incremento de L-Gln podría estar reflejando el aumento de la masa muscular correspondiente al paso de adulto-joven (48 días al inicio de los tratamientos) a adulto pleno (95 días al inicio de los tratamientos). El músculo como compartimento principal de proteínas tiene un importante papel en el intercambio de aminoácidos interorgánicos y, en especial, la Gln (Smith, 1990; Pinela *et al.*, 2006). El músculo sintetiza, almacena y libera Gln que representa el 20% del contenido de aminoácidos libres en músculo y el 30% del AA total liberado del músculo esquelético (Garber, 1980).

Armstrong y Stave (1973) estudiaron la variación de aminoácidos entre la población de ambos sexos de diferentes edades. La variación entre sexos se limitaba a un pequeño número de aminoácidos entre la población juvenil, pero se extendía a un



número mayor en la población adulta. Consideramos que con nuestro diseño experimental y con el análisis estadístico empleado, deberíamos haber encontrado interacciones entre los factores sexo y edad que no se han producido. No obstante, sí observamos un patrón sexodimorfo para cinco aminoácidos, de modo que L-Iso, L-leu y L-leu tuvieron valores superiores en las hembras y L-orn y Gly valores superiores en los machos. A este respecto, Armstrong y Stave (1973) también encontraron estas diferencias significativas entre hombres y mujeres adultos, pero no entre chicos y chicas adolescentes. Por otro lado, nosotros también comprobamos que la glicina libre en plasma mostró valores significativamente más elevados en machos que en hembras.

### **Interacción estadística entre sexo y alcohol**

Tres aminoácidos (L-Iso, L-Gln y L-Orn) mostraron una interacción entre la exposición al alcohol y el factor sexo. En relación a estos datos, desde el punto de vista del metabolismo se conoce que algunas variables farmacocinéticas del alcohol muestran un patrón sexodimorfo. Entre ellas destacan el metabolismo de primer paso, que es bastante superior en hombres y el volumen de distribución menor en mujeres (Soldin y Mattison, 2009).

### **Análisis multivariado factorial exploratorio**

La realización de un análisis multivariado factorial exploratorio tuvo como objetivo identificar una estructura de factores subyacentes que permitiera explicar la variabilidad de las concentraciones de los once aminoácidos cuantificados de los grupos sometidos a los diferentes tratamientos.

Los cuatro factores encontrados han resultado útiles para diferenciar a los sujetos en función del tratamiento que recibieron. F1 (L-ser, L-leu, L-iso, L-gln), es el factor más importante a la hora de describir la relación entre las variables. En el ANOVA de este factor, además de observarse diferencias significativas debidas al tratamiento, se encontraron diferencias en función de la edad y del sexo, así como una interacción significativa entre el sexo y el tratamiento. Por tanto, el efecto principal del tratamiento está modulado por el sexo de las ratas y debe ser interpretado teniendo en cuenta este aspecto. En el grupo de hembras, aquellas que recibieron cocaína son significativamente diferentes de las de los demás grupos de administración. En los machos, los metabolitos que configuran la dimensión F1

parecen afectados por igual en las condiciones en las que se administró alcohol, cocaína y alcohol + cocaína, sin diferencias entre ellos, pero sí respecto al grupo salino. Entre los machos y las hembras, la diferencia máxima se encontró en el grupo de cocaína, sin que se apreciaran cambios importantes entre ambos sexos cuando se suministraba alcohol solo o alcohol + cocaína. Por otra parte, F2 (L-ala, L-pro, L-thr) es un factor destacado para diferenciar los efectos de la administración conjunta de alcohol y cocaína frente al grupo de control salino. A su vez, F3 (Gly, L-glu y Tau) diferencia entre la administración individual de alcohol y cocaína y, además, los metabolitos con saturaciones altas en este factor presentan distinta variabilidad en jóvenes y adultos. Finalmente, F4 (Gly, Tau, L-glu) distingue los efectos entre la de administración de alcohol solo o en combinación con cocaína respecto al grupo salino y, al igual que F1, diferencia en función del sexo.

### 5.3. Discusión de los resultados del Estudio III

#### Conducta de autoadministración intravenosa de drogas

En el Estudio III se pretendió establecer un procedimiento que permitiera evaluar el efecto conjunto de la autoadministración intravenosa de cocaína y alcohol en ratas de laboratorio. Se consideró la gran validez ecológica del modelo de autoadministración intravenosa de drogas de abuso, así como otras ventajas sobre el modelo de administración pasiva empleado en los Estudios I y II. El haber empleado un procedimiento de condicionamiento operante, que posibilitó que las dos drogas pudieran ser autoadministradas conjuntamente y de manera crónica en animales jóvenes de ambos sexos, es de gran interés para el estudio de las consecuencias de este tipo de policonsumo en humanos. También se obtuvieron muestras plasmáticas de los animales para, posteriormente, determinar los niveles de los diferentes tipos de aminoácidos, dado que se ha comprobado que alteraciones en las concentraciones de ciertos tipos de aminoácidos pueden tener una función en enfermedades como el autismo (Zavala *et al.* 2001) y la depresión (Altamura *et al.* 1995) entre otras.

Son escasos los trabajos previos en la literatura científica en los que animales de laboratorio se hayan autoadministrado por vía intravenosa conjuntamente ambas drogas. Uno de ellos es el de Ikegami *et al.* (2002) en el que ratas adultas macho se autoadministraron cocaína y alcohol como un procedimiento de pre-exposición al alcohol con el objetivo de facilitar que los animales se autoadministraran posteriormente solamente alcohol por vía intravenosa. El otro trabajo es el de Winger *et al.* (2007) en el que estudiaron en monos rhesus (3 machos y 3 hembras) si la autoadministración conjunta de alcohol junto con otras drogas, como el ácido gamma hidroxibutirato (GHB) o flunitracepán o cocaína, podría aumentar las propiedades reforzadoras de estas últimas. Todos los monos rhesus empleados en este estudio tenían una historia previa de consumo de otras drogas y no eran experimentalmente "naïves". A diferencia de estos dos trabajos, en nuestro estudio se trató de caracterizar más detalladamente la conducta de autoadministración conjunta de cocaína y alcohol en sí misma, con el fin de describir una metodología conductual que pudiera ser de utilidad para otros estudios biológicos. Con ese propósito, se analizaron las fases de adquisición y de mantenimiento de esta conducta en ratas jóvenes de ambos sexos no expuestas previamente a ninguna droga de abuso. Se estudió, además, esas mismas fases en la conducta de autoadministración de cocaína sola, a efectos comparativos.

Los resultados mostraron que la presencia conjunta de cocaína y alcohol facilitó un aprendizaje más rápido de la conducta de autoadministración en las hembras en comparación con los machos (Figura 34). No se encontraron, sin embargo, esas diferencias entre sexos en el caso de que la cocaína fuera la única droga autoadministrada. Estos resultados sugieren que puede haber diferentes sensibilidades entre machos y hembras ante las propiedades reforzadoras de la combinación de ambas drogas. Según nuestros datos, aparentemente las ratas hembra serían más susceptibles a dichas propiedades en la fase inicial de la adquisición de esta conducta. Sin embargo, una vez adquirida la conducta de autoadministración, durante la siguiente fase, la de mantenimiento, no se mantuvieron las diferencias entre hembras y machos de los grupos de cocaína y alcohol (Figura 35). En esta fase de mantenimiento, tampoco se encontraron diferencias entre los animales que se autoadministraron conjuntamente alcohol y cocaína y entre los que se autoadministraron cocaína solamente. No obstante, es claramente significativa la diferencia entre los grupos de autoadministración de drogas y los de suero salino, demostrándose que la combinación de cocaína y alcohol es un estímulo reforzador para los animales de ambos sexos y que la presencia de alcohol no disminuye las propiedades reforzadoras de la cocaína, al menos en roedores de laboratorio y en las condiciones particulares de nuestro estudio. En este sentido, estos resultados no concuerdan con los de Winger *et al.* (2007) en monos rhesus, en los que estos autores indicaron que la autoadministración conjunta de ambas drogas (alcohol: 50, 100 o 200 mg/kg p.v./inyección; cocaína: 0.01 o 0.03 mg/kg p.v./inyección) redujo las propiedades reforzadoras de la cocaína. Es posible, no obstante, que los resultados de nuestro estudio se diferencien de los de esos autores no sólo por la especie animal empleada, sino también por las dosis de cocaína que fueron sensiblemente más bajas en su trabajo (0,01 a 0,03 mg/kg p.v./inyección) que en el nuestro (1 mg/kg p.v./inyección). A este respecto, Ikegami *et al.* (2002) comprobaron que a una concentración constante de alcohol (125 mg/kg p.v./inyección), que es muy similar a la nuestra (133 mg/kg p.v./inyección), cuando iban reduciendo progresivamente la concentración de cocaína desde 0,75 a 0,1 mg/kg p.v./inyección, al llegar a la dosis de 0,40 mg/kg p.v./inyección de cocaína, si comparaban las respuestas de autoadministración conjunta de cocaína y alcohol (125 mg/kg p.v./inyección de etanol más 0,4 mg/kg/inyección de cocaína) y las respuestas de autoadministración de cocaína sola (0,4 mg/kg p.v./inyección), éstas eran menores. Estos datos sugieren que, posiblemente, se requiera de una dosis mínima de cocaína para que sea la dosis de alcohol la fundamental en el mantenimiento de la conducta de autoadministración conjunta de ambas drogas. No

debe descartarse, por otra parte, la posible importancia de la formación del metabolito cocaetileno en el mantenimiento de la conducta de autoadministración conjunta de cocaína y etanol. La inhibición por el alcohol de la hidrólisis del grupo éster metílico de la cocaína por parte de las carboxilesterasas, genera una menor producción del metabolito no psicoactivo benzoilecgonina, lo que implica que la cocaína requiera de más tiempo para su metabolización y esté más tiempo en el plasma, y por el otro, estas carboxilesterasas catalizan el paso de la cocaína al cocaetileno (Rafla y Epstein, 1979; Dean, *et al.*, 1995) con sus propios efectos reforzadores que se añaden a los propios de la cocaína y los del alcohol. Es bien conocido que este metabolito es autoadministrado por ratas de laboratorio y es positivo en el modelo del Condicionamiento de la Preferencia de Lugar, lo cual indica que tiene propiedades reforzadoras equiparables a las de la cocaína sola.

### **Aminoácidos libres en plasma**

Tras el análisis de las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos, encontramos diferencias significativas entre sexos en siete de los catorce aminoácidos que estudiamos (L-Orn, L-Gln, L-Ala, Gly, L-Tyr, L-Phe y L-Val), siendo generalmente los niveles mayores en los machos que en las hembras (con la excepción de L-Gln), independientemente del tratamiento. También hemos encontrado diferencias entre sexos en aminoácidos aromáticos (AAA), en los de cadena ramificada (BCAA) y en la Ratio L-Glu/L-Gln. Es de especial interés destacar que las concentraciones de L-Tyr fueron diferentes estadísticamente en función del tratamiento. En comparación con los animales controles, tanto en el grupo de cocaína sola como en el de cocaína combinada con alcohol, los niveles de ese aminoácido bajaron en machos y en hembras. Se encontraron, además, diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en la Ratio L-Tyr/L-Phe y en la Ratio BCAA/L-Tyr. Como sabemos, L-Phe y L-Tyr son precursores de las catecolaminas. La fenilalanina es un aminoácido esencial y su conversión hacia tirosina es catalizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa. Por su parte, la Tirosina hidroxilasa (TH) es una enzima que participa en la conversión de la tirosina a L-Dopa que, como sabemos es la molécula precursora de la dopamina. La hidroxilación de fenilalanina a tirosina, aunque se produce principalmente en el hígado, también se produce en el SNC y en la médula adrenal donde es catalizada por la propia tirosina hidroxilasa (Ikeda, 1965). Se ha descrito que en consumidores problemáticos de cocaína la ratio L-Tyr/L-Phe es especialmente baja (Tennant, 1985) y que también está disminuida en la enfermedad de Parkinson (Hirayama, *et al.*, 2016). Estas dos patologías se caracterizan por mostrar niveles bajos de dopamina cerebrales

y ello podría ser debido a que los niveles del aminoácido precursor de la dopamina (la tirosina) estuvieran más bajos en presencia de la cocaína, un hecho que puede ser detectado en el plasma, como hemos comprobado en este estudio y que podría ser de validez como posible indicador de alteraciones en los niveles de dopamina cerebrales. Por su parte, es bien conocido que la ratio BCAA/L-Tyr es un buen indicador del metabolismo hepático, con lo que podría ser también de utilidad como marcador de las posibles alteraciones en la relación entre aminoácidos de cadena ramificada y la tirosina en consumidores de cocaína y alcohol. Por otro lado, como conocemos, en la síntesis de catecolaminas la TH es la enzima limitante de la velocidad de síntesis de DA y, dado que en nuestro estudio hay un claro sexodimorfismo en los niveles bajos de tirosina en las hembras, se podría considerar que los estrógenos pudieran tener una función en estos resultados. Así, se ha demostrado que los estrógenos regulan la expresión de TH (Ivanova y Beyer, 2003) y que la ovariectomía en roedores adultos (ratones y ratas) reduce el número de células inmunoreactivas a la hidroxilasa de tirosina, pero el reemplazo con agonista de  $\beta$ -estradiol previene o disminuye la pérdida de células (Johnson *et al.*, 2010).

Es preciso señalar también que existen diferencias entre sexos en cuanto a las variables farmacocinéticas que afectan a la metabolización de ambas drogas y que podrían contribuir al sexodimorfismo encontrado, tanto en la conducta como en patrón de aminoácidos. Así, los niveles plasmáticos de metabolitos de la cocaína como ecgonina metil-éster y norcocaína están aumentados en hembras, mientras que los de la benzoilecgonina lo están en machos (Festa, 2004). Respecto al alcohol, el metabolismo de primer paso es superior en hombres y un volumen de distribución menor en mujeres (Soldin y Mattison, 2009).

Consideramos, finalmente, que con el Estudio III hemos demostrado por primera vez en la literatura científica que roedores de laboratorio, jóvenes-adultos de ambos sexos, son capaces de autoadministrarse cocaína y alcohol conjuntamente y con facilidad. Debido a las ventajas que la autoadministración intravenosa aporta, tanto en el manejo de las variables conductuales como en el control de las farmacocinéticas, esta metodología debe de ser considerada como de especial interés en estudios de policonsumo de estas dos sustancias. Con ella, también hemos descrito por primera vez que se producen cambios en marcadores metabólicos relacionados con la tirosina cuando hay un consumo voluntario de cocaína y alcohol conjuntamente. Es obvio que estos datos son sólo primeros pasos que pueden promover más estudios que avancen en el conocimiento de otros patrones conductuales y neurofisiológicos,

los cuales son necesarios para comprender los procesos que subyacen en el abultado policonsumo de ambas drogas en las sociedades desarrolladas.

## 5. 4. Discusión global

En esta Memoria se han descrito trabajos realizados con modelos animales de administración intravenosa de dos drogas de abuso de consumo muy prevalente, como son la cocaína y el alcohol. La metodología de administración pasiva mantenida durante 21 días en los Estudios I y II, nos permitió comprobar que los animales no mostraban efectos tóxicos apreciables externamente y por su conducta abierta espontánea, tras la exposición por vía intravenosa a dosis conjuntas de cocaína y alcohol que mantienen la conducta de autoadministración intravenosa de drogas en modelos animales. Ello permitió que en el Tercer Estudio se añadiera el componente de voluntariedad en el consumo, empleando la referida metodología, basada en procedimientos de condicionamiento operante, sin alterar las dosis de los dos Estudios previos ni el carácter crónico en cuanto al número de sesiones.

El objetivo esencial de los trabajos descritos en esta Memoria es el de intentar disponer de un modelo animal con el que se pueda abordar el policonsumo de drogas en el laboratorio, que proporcione la mayor validez ecológica experimental posible para poder entender mejor los mecanismos últimos que pueden estar interviniendo en este tipo de consumo problemático humano y, en su caso, ayudar a establecer terapias adecuadas. En la investigación básica preclínica se tiende necesariamente a la simplificación de las variables a la hora de realizar el diseño experimental. Por el contrario, la actividad clínica debe luchar con los efectos de un patrón de consumo de drogas, donde el monoconsumo es casi la excepción. Una prueba de esta carencia es la muy escasa literatura científica que describa trabajos donde se emplee el modelo de autoadministración intravenosa simultánea de cocaína y alcohol, por lo que lo expuesto en esta Memoria pensamos puede contribuir, de alguna forma, a paliar esta carencia.

En los Estudios II y III se incluyeron ratas hembras y machos con la intención de observar que las diferencias entre sexos, farmacocinéticas, farmacodinámicas o de otro tipo, pueden tener un reflejo en las variables metabólicas o conductuales valoradas. Es casi ya una recomendación general, en toda investigación farmacológica, el considerar que pueda haber patrones sexodimorfos en las variables sometidas a estudio. En este caso, gracias a esta inclusión en el diseño experimental se obtuvieron datos que apuntan a diferencias en el perfil de aminoácidos entre machos y hembras tras la exposición conjunta a esas dos sustancias.



Por su parte, también consideramos interesante destacar la observación descrita en nuestro estudio de una mayor vulnerabilidad de las hembras a adquirir más rápidamente y con una mayor escalada la conducta de consumo de la combinación de cocaína y alcohol. La etapa del desarrollo de los individuos fue también considerada en nuestro diseño experimental teniendo en cuenta la edad de inicio media de la población española en el consumo de cocaína, 21 años, y la del de alcohol, 16 años. Por esta razón, se emplearon ratas de 48 días en el Estudio I y 52 en el Estudio III simulando en el modelo animal de rata una etapa del desarrollo en la que, aunque ya se ha sobrepasado la adolescencia, no se ha alcanzado la etapa adulta de una forma total.

En los tres estudios quisimos evaluar el patrón plasmático de aminoácidos, primero, por la gran validez traslacional que tiene el plasma como matriz de análisis y, segundo, porque se ha descrito de forma consistente en la literatura científica que alteraciones en los niveles de aminoácidos plasmáticos pueden participar en diversos trastornos del comportamiento. Consideramos que nuestros resultados aportan datos que pueden ser de interés. Por ejemplo, la ratio L-Tyr/L-Phe parece tener un efecto opuesto cuando la cocaína está presente en el organismo en comparación con la presencia de esa droga conjuntamente con la del alcohol. A este respecto, la tirosina libre en plasma parece ser un marcador que refleja cambios más permanentes puesto que, incluso después de 48 horas de lavado farmacológico, se observa que los niveles de tirosina, en sí mismos o relacionados con los de otros aminoácidos, se mantienen alterados en función del tratamiento. Por tanto, ese aminoácido puede ser un posible candidato que forme parte de algún biomarcador. Por otro lado, el mayor agotamiento de L-Tyr observado en las hembras C+A podría tener relación con su escalada más rápida en la adquisición de la conducta de autoadministración conjunta de ambas drogas.

Del análisis de los datos procedentes de las proteínas de anclaje de receptores gefirina y PSD-95 y de la expresión de los receptores de neurotransmisores de nuestro estudio se desprende que, tanto la neurotransmisión GABAérgica como la glutamatérgica, se ven afectadas por la exposición a estas dos drogas en diferentes regiones del sistema mesocorticolímbico. Entre las cuatro regiones estudiadas, la CPFm destaca como el área más afectada en el caso de las subunidades GABA y el NAC en las del glutamato.

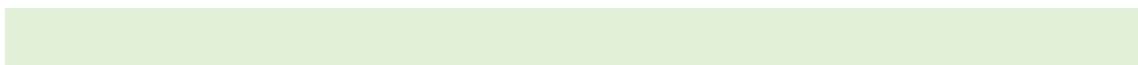
Este estudio es novedoso y el primero, que conozcamos, que se ha centrado en un modelo de policonsumo en general y, en particular, de la combinación de dos sustancias como la cocaína y el alcohol que son drogas de un consumo muy prevalente

en nuestro país y en otros países de nuestro entorno. Los efectos adversos sobre la salud que este policonsumo conlleva, hace muy necesario seguir explorando las interacciones y sinergias que pueden darse entre esas dos sustancias, por lo que los datos descritos aquí son sólo una mínima contribución a otros trabajos futuros que enfoquen sus esfuerzos hacia este fin.





## 6. Conclusiones





## 6. Conclusiones

1. La administración crónica por vía intravenosa, tanto de forma pasiva como voluntaria, de cocaína y alcohol no induce efectos tóxicos observables en ratas Wistar jóvenes y adultas de ambos sexos.
2. La administración crónica de forma pasiva de cocaína altera las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos L-Ala, L-Iso, L-Leu, L-Glu y L-Ser, mientras que la de alcohol lo hace en los aminoácidos L-Ala, L-Asp, L-Gln, L-Orn y L-Ser, habiéndose encontrado una interacción entre tratamientos para L-Iso y L-Ser.
3. La administración crónica de forma pasiva de cocaína tiene efectos diferentes en función del sexo sobre la concentración plasmática de los aminoácidos L-Pro y L-Leu, mientras que la de alcohol la tiene sobre los aminoácidos L-Iso, L-Gln y L-Orn.
4. En ratas jóvenes, la administración crónica de forma pasiva de cocaína, alcohol y de cocaína conjuntamente con alcohol altera los niveles de la proteína sináptica de anclaje gefirina en el hipocampo y en el núcleo accumbens, así como el balance PSD-95/gefirina en el hipocampo.
5. En ratas jóvenes, la administración crónica de forma pasiva de cocaína, alcohol y de cocaína conjuntamente con alcohol altera la expresión génica de subunidades de los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA, de los GABAérgicos y de los endocannabinoides en estructuras del sistema mesocorticolímbico como la corteza prefrontal medial, el hipocampo, el núcleo accumbens y la amígdala.
6. La adquisición de la conducta de autoadministración intravenosa de la combinación de cocaína y alcohol en ratas jóvenes requiere de un menor tiempo en las hembras que en los machos.
7. La autoadministración intravenosa conjunta de cocaína y alcohol, mantenida durante 21 días, induce un descenso de la concentración plasmática de L-Tyr, observable después de 48 horas de lavado farmacológico, comparada a la autoadministración de cocaína sola y de suero salino.





## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abad, F. J., Olea, J., Ponsoda, V., & García, C. (2011).** Medición en ciencias sociales y de la salud. Madrid, España: Síntesis.

**Abdel-Nabi, R., Milakofsky, L., Hofford, J.M., Hare, T.A., Vogel, W.H. (1995).** Effect of Ethanol on Amino Acids and Related Compounds in Rat Plasma, Herat, Aorta, Bronchus, and Pancreas. *Alcohol*, 13, 171-174.

**Abu Aboud, O., Weiss, R.H. (2013).** New Opportunities from the Cancer Metabolome. *Clinical Chemistry*, 59(1) 138–146.

**Acosta, G.B. (2006).** La L-serina en el Sistema Nervioso Central y su posible implicación en la clínica. *Psicofarmacología*, 5, 20-25.

**Acosta, G., Hasenkamp, W., Daunais, J.B., Friedman, D.P., Grant, K.A., Hemby, S.E. (2010).** Ethanol self-administration modulation of NMDA receptor subunit and related synaptic protein mRNA expression in prefrontal cortical fields in cynomolgus monkeys. *BRAIN RESEARCH* 1318 (2010) 144 – 154.

**Aldred, M.J., Mulder-Rosi, J., Lingenfelter, S.E., Chen, G., Luscher, B. (2005).** Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABAA receptors and gephyrin. *J Neurosci*, 25, 594–603.

**Altamura, C.A., Mauri, M.C., Ferrara, A., Moro, A.R., D'Andrea, G., *et al.* (1993).** Plasma and platelet aminoacids in psychiatric disorders. *American Journal Psychiatry* 150: 1731-1733.

**Altamura, C., Maes, M., Dai, J., Meltzer, H.Y. (1995).** Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *European Neuropsychopharmacology Supplement X*: 71-75.

**American Psychiatric Association. (2014).** Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed., text rev.). Washington, DC:

**Aragón, C., Miquel, M., Correa, M., Sanchis-Segura, C. (2002).** Alcohol y metabolismo humano.

**Arias S.A., Dumas O., Sullivan, A.F., Boudreaux E.D., Miller, I., and Camargo, C.A. Jr (2016).** Substance Use as a Mediator of the Association Between Demographics, Suicide Attempt History, and Future Suicide Attempts in Emergency Department Patients Crisis 2016 DOI: 10.1027/0227-5910/a000380

- Armstrong, M.D., Stave, U. (1973).** A Study of Plasma Free Amino Acid Levels. III. Variations During Growth and Aging. *Metabolism*, 22(4), 571-578.
- Arnold, J.C. (2005).** The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81, 396 – 406.
- Arnold, J.C., Topples, A.N., a,b, Hunt, G.E., McGregor, I.S. (1998).** Effects of pre-exposure and co-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 on behavioral sensitization to cocaine. *European Journal of Pharmacology*, 354, 9–16.
- Aspen, J.M., Winger, G., 1997.** Ethanol effects on self-administration of alfentanil, cocaine, and nomifensine in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl.)* 130, 222–227.
- Ator, N.A., Griffiths, R.R. (1987).** Self-administration of barbiturates and benzodiazepines: A review. *PHARMACOL BIOCHEM BEHAV* 27(2) 391-398, 1987.
- Ayesta, F.J. (2002).** Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol. *Adicciones*, 14(1), 63-78.
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., Arias-Montaña, J.A. (2000).** Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed*, 11, 39-60.
- Bardo, M.T., Bevins, R.A. (2000).** Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153, 31-43
- Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., et al. (1998).** International Union of Pharmacology. XV Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev*, 50(2), 291–313.
- Becker, J.B., Hu, M. (2008).** Sex differences in drug abuse. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 36–47.
- Becker, J.B., McClellan, M.L., Reed, B.G. (2017).** Sex Differences, Gender and Addiction. *Journal of Neuroscience Research*, 95, 136–147.
- Beecher, C.W.W. (2003).** The human metabolome. In *metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis*, 2003. pp. 311-319.
- Bell, R.L. Hausera, S.R., Liangb, T., Saric, Y., Maldonado-Devincid, A., Rodd, Z.A. (2017).** Rat animal models for screening medications to treat alcohol use disorders. *Neuropharmacology*, 122, 201–243.
- Benzaquen, B.S., Cohen, V., Eisenberg, M.J. (2001).** Effects of cocaine on the coronary arteries. *Am Heart J*, 142(3), 402-410.
- Biggio, G., Porceddu, M.L., Gessa, G.L. (1996).** Decrease of homovanillic, dihydroxyphenylacetic acid and cyclic-adenosine-3X,5X-monophosphate content by the acute administration of an amino acid mixture lacking tyrosine and phenylalanine. *J Neurochem* 26:

1253–1255.

**Blanco, P., Sirvent, C. (2006).** Psicopatología asociada al consumo de cocaína y alcohol. *Revista Española de Drogodependencias*, 31 (3 y 4) 324-344.

**Bobadilla, A.C., Heinsbroek, J.A., Gipson, C.D., Griffin, W.C., Fowler, C.D., Kenny, P.J. & , Kalivas, P.W. (2017).** Corticostriatal plasticity, neuronal ensembles, and regulation of drug seeking behavior. *Prog. Brain Res.*, 235, 93-112.

**Boelsterli, U.A., Göldlin, C.R. (1991).** Biomechanisms of cocaine-induced hepatocyte injury mediated by the formation of reactive metabolites. *Arch Toxicol* 65: 351-60.

**Boelsterli, U.A., Wolf, A., Göldlin, C.R. (1993).** Oxygen free radical production mediated by cocaine and ethanol-derived metabolite cocaethylene in rat hepatocytes. *Hepatology*, 18, 1154-1161.

**Bornheim, L.M. (1998).** Effect of Cytochrome P450 Inducers on Cocaine-Mediated Hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 150, 158-165.

**Bouis, P., Boelsterli, U.A. (1990).** Modulation of cocaine metabolism in primary rat hepatocyte cultures: effects on irreversible binding and protein biosynthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 104, 429-39.

**Booij, L., Van der D, Riedel, W.J. (2003).** Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. 2003. *Molecular Psychiatry*, 8, 951-973.

**Brady, K.T., Sonne, S., Randall, C.L., Adinoff, B., Malcolm, R. (1995).** Features of cocaine dependence with concurrent alcohol abuse. *Drug and Alcohol Dependence*, 39, 69-71.

**Buck, K.J. (1996).** Molecular Genetic Analysis of the Role of GABAergic Systems in the Behavioral and Cellular Actions of Alcohol. *Behavior Genetics*, 26(3), 313-318.

**Buck, K.J., Harris R.A. (1990).** Benzodiazepine agonist and inverse agonist actions on GABA<sub>A</sub> receptor-operated chloride channels II. Chronic effects of ethanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 253(2), 713-719.

**Bühler, K-M., Huertas, E., Echeverry-Alzate, V., Giné, E., Moltó, E., Montoliu, L., Moreno, J.A. (2014).** Risky alcohol consumption in young people is associated with the fatty acid amide hydrolase gene polymorphism C385A and affective rating of drug pictures. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(3), 279–289.

**Bunney, E.B., Appel, S.B., Brodie, M.S. (2001).** Electrophysiological Effects of Cocaethylene, Cocaine, and Ethanol on Dopaminergic Neurons of the Ventral Tegmental Area. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297:696-703.

**Caille, S., Parsons, L.H. (2003).** SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. *Eur J Neurosci* 18:3145–3149.

- Calafat, A., Bohrn, K., Kokkevi, A., Maalsté, N., Mendes, F., Palmer, A., Sherlock, K., et al., (1999).** Night life in Europe and recreative drug use. Sonar Project. Palma de Mallorca:
- Cameron, D.L., William, J.T. (1994).** Cocaine Inhibits GABA Release in the VTA through Endogenous 5HT, *The Journal of Neuroscience*, November 1994, 74(11): 6763-6767.
- Campbell, U.C., Carroll, M.E. (2000).** Acquisition of Drug Self-Administration: Environmental and Pharmacological Interventions. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 8(3), 312-325.
- Cantinelà, R., Chersniakova, S. A., Saviolakis, G., Khan, R., Elkashef, Rose, L., Vocci, F. (2007).** Prevalence of abnormal liver-associated enzymes in cocaine experienced adults versus healthy volunteers during Phase 1 clinical trials. *Contemporary Clinical Trials*, 28, 695-704.
- Carroll, M.E., Lac ST (1993).** Autoshaping IV cocaine self-administration in rats: effects of nondrug alternative reinforcers on acquisition. *Psychopharmacology* 110:5-12.
- Carroll, M.E., Lac, S.T. (1997).** Acquisition of IV amphetamine and cocaine self-administration in rats as a function of dose. *Psychopharmacology* 129:206-214.
- Carroll, K. M., Rounsaville, B. J., Bryant, K. J. (1993).** Alcoholism in treatment seeking cocaine abusers: clinical and prognostic significance, *Journal of Studies on Alcohol*, 54, 199-208.
- Cascales, M., Zaragoza, A., Díez-Fernández, C., Fernández-Simón, L. (2004).** Metabolismo Oxidativo de la Cocaína en Hígado. Monografía Instituto de Bioquímica, CSIC. Pp 287-309.
- Chambers, R. A., Taylor, J. R., & Potenza, M. N. (2003).** Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *American Journal of Psychiatry*, 160(6), 1041-1052.
- Chandler, L.J., Norwood, D., Sutton, G. (1999).** Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23, 363-370.
- Chow MJ, Ambre JJ, Ruo TI, et al.** Kinetics of cocaine distribution, elimination, and chronotropic effects. *Clin Pharmacol Ther*, 38(3), 318-24.
- Cohen, S. M., Shulman, R. G., and McLaughlin, A. C. (1979)** Effects of ethanol on alanine metabolism in perfused mouse liver studied by <sup>13</sup>C NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4808-4812.
- Colantoni, A., Paglia, N.L., De Maria, N., Emanuele, M.A., Emanuele N.V., Idilman, R., Harig, J., Van Thiel, D.H. (2000).** Influence of Sex Hormonal Status on Alcohol-Induced Oxidative Injury in Male and Female Rat Liver. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 24(9), 1467-1473.
- Colombo G, Serra S, Vacca G, Carai MA, Gessa GL (2005)** Endocannabinoid system and alcohol addiction: pharmacological studies. *Pharmacol Biochem Behav* 81:369-380.

- Collins, R.J., Weeks, J.R., Cooper, M.J., Good, P.I., Russell, R.R. (1984).** Prediction of abuse liability of drugs using IV self-administration by rats. *Psychopharmacology* (1984) 82:6-13.
- Corominas, M., Roncero, C., Bruguera, E., Casas, M. (2007).** Sistema dopaminérgico y adicciones. *Rev Neurol*, 44 (1), 23-31.
- Costa, L.G., Manzo, L. (1995).** Biochemical markers of neurotoxicity: research strategies and epidemiological applications. *Toxicology Letters*, 77(1-3) 137-144.
- Craig, A. M., Banker, G., Chang, W., McGrath, M. E. & Serpinskaya, A. S. (1996).** Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci*, 16, 3166-3177.
- Crupp, L.A., (1981).** Investigation of intravenous ethanol self-administration in rats using a fixed ratio schedule of reinforcement. *Physiological Psychology*, 9(4) 359-363.
- Cummings, J.A., Jagannathan, L., Jackson, L.R., Becker, J.B. (2014).** Sex differences in the effects of estradiol in the nucleus accumbens and striatum on the response to cocaine: Neurochemistry and behavior. *Drug and Alcohol Dependence* 135, 22- 28.
- Cunningham, S.C., Corrigan, S.A., Malow, R.M., Samason, I.H. (1993).** Problems of Drug Dependence, 1993: Proceedings of the 55th Annual Scientific Meeting, The College on Problems of Drug Dependence, Inc. NIDA Research , 141, 1994.
- Dackis, C.H., Gold, M.S., (1985).** New concepts in cocaine addiction: the dopamine depletion hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev*, 9, 469-477.
- Dahchour, A., De Witte, P. (2000).** Taurine Blocks the Glutamate Increase in the Nucleus Accumbens Microdialysate of Ethanol-Dependent Rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 65: 345-350.
- De Luis, D.A., Alter, R., Izaola, O. (2009).** Arginina, indicaciones y aplicaciones clínicas. *Nutrición clínica en Medicina*, III(2), 82-93.
- De Wit, H., Wise, R.A. (1977).** Blockade of cocaine reinforcement in rats with the dopamine receptor blocker pimozide, but not with the noradrenergic blockers phentolamine or phenoxybenzamine. *Can J Psychol*, 3 1:195-203.
- Dean, R.A., Bosron, W.F., Zachman, F.M., Zhang, J. & Brzezinski, M.R. (1995).** Effects of Ethanol on Cocaine Metabolism and Disposition in the Rat. Chapter from National Institute on Drug Abuse.
- Dean, R. A., Christian, C. D., Sample, R. H. B., Bosron, W. F. (1992).** Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine. *ASEB J.*, 5, 2735-2739.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., et al. (1992).** Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-1949.
- Di Chiara, G., Acquas, E., Tanda, G. (1996).** Etanol as a neurochemical surrogate of

conventional reinforcers: the dopamine-opioid link. *Alcohol*, 13, 13-17.

**Di Chiara, G., Imperato, A. (1988).** Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. *Ann N Y Acad Sci*, 473, 367-81.

**Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J.C., Piomelli D. (1994)** Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686-691.

**Dick, D.M., Plunkett, J., Wetherill, L.F., Xuei, X., Goate, A., Hesselbrock, V., Schuckit, M., Crowe, R., Edenberg, H.J., Foroud. T. (2006).** Association Between GABRA1 and Drinking Behaviors in the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism Sample. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 30(7), 1101-1110.

**Djoume, E., Lawrence, A. (2002).** The Effect of Chronic Ethanol Consumption and Withdrawal on  $\mu$ -Opioid and Dopamine D1 and D2 Receptor Density in FawnHooded Rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(2), 551-559.

**D'Souza, M.S. (2015).** Glutamatergic transmission in drug reward: implications for drug addiction, *Front. Neurosci.*, 9, 404.

**Ehlers, M.D., Mammen, A.L., Lau, L.F., R.H. (1996).** Synaptic targeting of glutamate receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 484-489.

**EMCDDA and ESPAD (2016).** ESPAD Report 2015 — Results from the European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs, EMCDDA–ESPAD joint publications, Publications Office of the European Union, Luxembourg.

**Engblom, D., Bilbao, A., Sanchis-Segura, C., Dahan, L., Perreau-Lenz, S., Balland, B., Parkitna, J.R., Luja' n, R., Halbout, B., Mameli, M., et al. (2008).** Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron* 59, 497–508.

**Enoch, M.A. (2008).** The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 95–104.

**Enoch, M.A., Zhou, Z., Kimura, M., Mash, D.C., Yuan, Q., et al. (2012).** GABAergic Gene Expression in Postmortem Hippocampus from Alcoholics and Cocaine Addicts; Corresponding Findings in Alcohol-Naive P and NP Rats. *PLoS ONE* 7(1): e29369. doi:10.1371/journal.pone.0029369.

**Eriksson, K., 1969.** The estimation of heritability for the self selection of alcohol in albino rats. *Annals of Medical and Experimental Biology of Finland*, 47, 172-174.

**Eriksson, T., Magnusson, T., Carlsson, A., Hagman, M., Jagenburg, R.& Edén, S. (1981).** Effects of Hypophysectomy, Adrenalectomy and (–)-Propranolol on Ethanol-Induced Decrease in Plasma Amino Acids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 317, 214-218.

- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J.A., Fritschy, J.M. Lüscher, B. (1998).** Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the  $\gamma 2$  subunit and gephyrin. *nature neuroscience*, 1(7), 563-571.
- Fadda, F., Mosca, E., Colombo, G., Gessa, G.I. (1989).** Effect of spontaneous ingestion of ethanol on brain dopamine metabolism. *Life Sciences*, 44(4), 281-28.
- Fadda F, Rossetti Z.L. (1998).** Chronic ethanol consumption from neuroadaptation to neurogeneration. *Prog Neurobiol*, 56, 385-431.
- Fagg, G. E. & Foster, A. C. (1983).** Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience*, 9(4), 701-719.
- Farré, M., de la Torre, R., Llorente, M., Lamas, X., Ugena, B., Segura, J., Cami, J. (1993).** Alcohol and Cocaine Interactions in Humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 266(3), 1364-1373.
- Fattore, L., Martellota, M.C., Cossu, G., Mascia, M.S., Fratta, W. (1999).** CB1 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 104(1-2), 141-146.
- Felig P., Pozefsky T., Marliss E., Cahill G.F. Jr. (1970).** Alanine: key role in gluconeogenesis. *Science*, 167, 1003-1004. doi:10.1126/science.167.3920.1003.
- Fernando H, Bhopale KK, Kondraganti S, Kaphalia BS, Shakeel Ansari GA. (2011).** Lipidomic changes in rat liver after long-term exposure to ethanol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255(2), 127–137.
- Festa, E. D., Russo, S. J., Gazi, F. M., Niyomchai, T., Kemen, L. M., Lin, S. N., ... & Quinones-Jenab, V. (2004).** Sex differences in cocaine-induced behavioral responses, pharmacokinetics, and monoamine levels. *Neuropharmacology*, 46(5), 672-687.
- Figliomeni, M.L., Abdel-Rahman, M.S. (1997).** The effect of Etanol Exposure onCocaine Toxicity in Rat Hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 11, 321-328.
- Figliomeni, ML, Abdel-Rahman MS. (1998).** Ethanol does not increase the hepatotoxicity of cocaine in primary rat hepatocyte culture. *Toxicology*, 129, 125-135.
- Fish F, Wilson WDC. (1969).** Excretion of cocaine and its metabolites in man. *J Pharm Pharmacol*, 21, 135-139.
- Foltin RW, Fischman MW. (1992),** Self-administration of cocaine by humans: choice between smoked and intravenous cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, 261 (3): 841-9.
- Forteschi, M., Sotgia, S., Assaretti, S., Arru, D., Cambedda, D., Sotgiu, E., Zinellu, A. and Carru, C. (2015).** Simultaneous determination of aromatic amino acids in human blood plasma by capillary electrophoresis with UV-absorption detection. *J Sep Science*, 38, 1794–1799. doi:10.1002/jssc.201500038



- Fredriksson, I., Adhikary, S., Steensland, P., Vendruscolo, L.F., Bonci, A., Shaham, Y., Bossert, J.M. (2017).** Prior Exposure to Alcohol Has No Effect on Cocaine Self-Administration and Relapse in Rats: Evidence from a Rat Model that Does Not Support the Gateway Hypothesis.. *Neuropsychopharmacology*, 42(5), 1001-1011. doi: 10.1038/npp.2016.209.
- Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D. (2003).** Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, 83, 1017–1066.
- Fride, E. (2005).** Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4, 633.642.
- Fujiyama, F., Stephenson, F. A., and Bolam, J. P. (2002).** Synaptic localization of GABA(A) receptor subunits in the substantia nigra of the rat: effects of quinolinic acid lesions of the striatum. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1961–1975.
- Garber, A.J. (1980).** Glutamine metabolism in skeletal muscle. In: Mora J, Palacios R, editors. *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation*. New York: Academic Press; 1980, p. 259–84.
- García, M.P., Roger, C., de la Rubia, J.E., Aguilar, M.P. (2017).** Modelos animales de adicción a las drogas. *Adicciones* vol.29, nº4 · 2017.
- Gass, J.T., Olive, M.F. (2008).** Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochemical pharmacology*, 75, 218–265.
- Gatto, G.J., McBride, W.J., Mrphy, J.M., Lumeng, L., Li, T.K. (1994).** Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol*, 11, 557-564.
- Gawin, F.H. (1991).** Cocaine Addiction: Psychology and Neurophysiology Gawin, Frank H Science, 251, 1580-1586.
- Gessa, G.L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L. y Mereu, G. (1985).** Low doses of etanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental área. *Brain Res*, 348, 201-203.
- Gianoulakis, C., (2001).** Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *J Psychiatry Neurosci*, 26(4), 304-18.
- Gika HG, Ji C, Theodoridis GA, Michopoulos F, Kaplowitz N, Wilson ID. (2012).** Investigation of chronic alcohol consumption in rodents via ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry based metabolite profiling. *J. Chromatogr. A* 1259, 128–137 (2012).
- Gika, H.G., Wilson, I.D. (2014).** Global metabolic profiling for the study of alcohol-related disorders. *Bioanalysis*, 6(1), 59–77.
- Gil, F. (2000).** El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. Departamento de Medicina Legal y Toxicología Facultad de Medicina de la Universidad de Granada. <http://www.ugr.es/~fgil/biomarcadoresrevtoxicol.pdf>



- Gödlín, C.R. & Boelsterli, U.A. (1991).** Reactive oxygen species and non-peroxidative mechanisms of cocaine-induced cytotoxicity in rat hepatocyte cultures. *Toxicology*, 69(1), 79–91. doi:10.1016/0300-483X(91)90155-T
- Gómez-Lechón, M.J., Cascales, M. (2005).** Las ómicas en el desarrollo de nuevos fármacos. Las ómicas: genómica, proteómica, citómica y metabolómica: modernas tecnologías para el desarrollo de fármacos. Madrid: Instituto de España; Real Academia de Farmacia; 2005:301.
- González, S., Fernández-Ruiz, J., Spargaglione, V., Parolaro, D., Ramos, J.A. (2002).** Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB1 receptor binding and mRNA levels. *Drug and Alcohol Dependence*, 66, 77–84.
- Griffiths, R.R., Brady, J.V., Bradford, L.D., 1979.** Predicting the abuse liability of drugs with animal drug self-administration procedures: Psychomotor stimulants and hallucinogens. In: Thompson, T., Dews, P.B. (Eds.), *Advances in Behavioral Pharmacology*, 2. Academic Press, New York, pp. 163-208.
- Guerri C. (2000).** Cómo actúa el alcohol en nuestro cerebro. *Trastornos adictivos*, 2(1), 14-25.
- Guerri, C. (2012).** Bioquímica de las adicciones. *SEBBM*, 172, Junio de 2012.
- Hagman, M., Jagenburg, R. (1990).** Effect of 4-methylpyrazole on ethanol-induced decrease in rat plasma amino-acids. *Biochemical Pharmacology*, 38(1), 105-108.
- Hagman, M., Eriksson, T. (1991).** Development of Tolerante to the Plasma Amino Acid-Decreasing Effect of Etanol in the Rat. *J Pharm Pharmacol*, 43, 625-629.
- Hall, F.S., Soara, I., Drgonova, J., Li, S-F., Goeb, M., Uhl, G.R. (2004).** Molecular Mechanisms Underlying the Rewarding Effects of Cocaine. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1025, 47–56.
- Hansson, A.C., Bermudez-Silva, F-J., Malinen, H., Hyttia, P., et al. (2007).** Genetic Impairment of Frontocortical Endocannabinoid Degradation and High Alcohol Preference. *Neuropsychopharmacology*, 32, 117–126.
- Harper, C., Matsumoto, I. (2005).** Ethanol and brain damage. *Current Opinion in Pharmacology* 2005, 5:73–78.
- Harris, D.S., Everhart, E.T., Mendelson, J., Jones, R.T. (2003).** The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. *Drug Alcohol Depend*, 72(2), 169–182.
- Hawks, R.L., Chiang, C.N. (1986).** Urine testing for drugs of abuse. National Institut on Drug Abuse (NIDA) Research Monograph 73. 1986 .
- Heikkila RE, Orlansky H, Cohen G. (1975).** Studies on the distinction between inhibition and release of 3H dopamine in rat brain tissue slices. *Biochem Pharmacol*, 24, 847-852.

- Herbst, E.D., Harris, D.S., Everhart, E.T., Mendelson, J., Jacob, P., Jones, R.T. (2011).** Cocaethylene Formation Following Etanol and Cocaine Administration by Different Routes. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 19(2), 95-104.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1990)** Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1932–1936.
- Herz, A. (1997).** Endogenous opioid systems and alcohol addiction *Psychopharmacology*, 129, 99–111.
- Hirabayashi, Y. (2012).** A world sphingolipids and glycolipids in the brain Novel funtctions of simple lipds modifieds with glucose. *Pro. Jpn. Acad. B.*, 88, 129-132.
- Hirayama M, Tsunoda M, Yamamoto M, Tsudad T, Ohnoe K (2016).** Serum Tyrosine-to-Phenylalanine Ratio is Low in Parkinson’s Disease. *Journal of Parkinson’s Disease* 6:423–431. DOI 10.3233/JPD-150736
- Holford, H.G. (1987).** Clinical Pharmacokinetics of Ethanol. *Clin Pharmacokinetics*, 13, 273-292.
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J. (2006).** Neural Mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, 29, 565-598.
- Hyytiä, P., Schulteis, G., Koob, G.F. (1996).** Intravenous heroin and ethanol self-administration by alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Psychopharmacology*, 125, 248–54.
- Ikeda, M., Levitt, M. & Udenfriend, S. (1965).** Hydroxylation of phenylalanine by purified preparations of adrenal and brain tyrosine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 18, 482-488.
- Ikegami, A., Olsen, C.M., Fleming, S.M., Guerra, E.E., Bittner, M.A., Wagner, J., Duvauchelle, C.L. (2002).** Intravenous ethanol/cocaine self-administration initiates high intake of intravenous ethanol alone. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72, 787–794.
- Ivanova, T., Beyer, C. (2003).** Estrogen regulates tyrosine hydroylase expression in the neonate mouse midbrain. *J Neurobiol*, 54, 638–647.
- Jatlow, P.I. (1987).** Drug of abuse profile: cocaine. *Clin Chern* 1987; 33 (II Suppl.): 66B-71B.
- Jatlow, P. (1988).** Cocaine: Analysis, Pharmacokinetics, and Metabolic Disposition. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 61, 105-113.
- Jatlow, P., Elsworth, J.D., Bradberry, C.W., Winger, G., Taylor. J.R., Russel, R., Roth, R.H. (1991).** Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine–ethanol ingestion. *Life Sci*, 48, 1787–94.
- Johnson, M.L., Ho, C.C., Day, A.E., Walker, Q.D., Francis, R., Kuhn, C.M. (2010).** Oestrogen Receptors Enhance Dopamine Neurone Survival in Rat Midbrain. *J Neuroendocrinol*, 22, 226–237.
- Johnston, G.A.R. (1996).** GABAA Receptor Pharmacology. *Pharmacol Ther*, 69(3), 173-198.

- Kalivas, P.W. (2004).** Glutamate systems in cocaine addiction Peter W Kalivas. *Current Opinion in Pharmacology*, 4, 23–29.
- Kalivas, P. W., Volkow, N. D. (2005).** The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, 162; 1403-13.
- Karler, R., Calder, L.D., Chaudhry, I.A., Turkanis, S.A. (1989).** Blockade of “reverse tolerance” to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci*, 45, 599–606.
- Katz JL, Terry P, Witkin JM (1992).** Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaine ethylester (cocaethylene). *Life Sci*50:1351–1361.
- Keilin, D., and Hartree, E. F. (1945).** *Biochem. J.*, 39, 293.
- Keith D., Hussein, A. (2008).** Excitation control: balancing PSD-95 function at the synapse. *Front. Mol Neurosci*, 1. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.004.2008>
- Kelly, B.C., and Parsons, J.T. (2008).** Predictors and Comparisons of Polydrug and Non-Polydrug Cocaine Use in Club Subcultures. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 34, 774–781.
- Kirsch, J., Betz, H. (1995).** The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cy- toskeleton. *J Neurosci*, 15, 4148-4156.
- Kitsch, J., Langosch, D., Prior, P., Littauer, U. Z., Schmitt, B., and Betz, H. (1991).** The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem*, 266, 22242-22245.
- Knackstedt, L.A., Ettenberg, A., 2005.** Ethanol consumption reduces the adverse consequences of self-administered intravenous cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 178, 143–150.
- Knackstedt, L.A., Ben-Shahar, O., Ettenberg, A., 2006.** Alcohol consumption is preferred to water in rats pretreated with intravenous cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85, 281–286.
- Kloss, M.W., Rosen, G.M. & Rauckman, E. J. (1984).** Cocaine-mediated Hepatotoxicity a Critical Review. *Biochemical Pharmacology*, 33(2), 169-173.
- Koob, G. F., Le Moal, M. (2001).** Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24; 97-129.
- Koob, G.F. Volkow, N.D. (2010).** Neurocircuitry of Addiction, *Neuropsychopharmacology Reviews*, 35, 217–238.
- Kozawa, S., Yukawa, N., Liu, J. Shimamoto, A., Kakizaki, E., Jujimiya, T. (2007).** Effect of chonic ethanol administration on disposition of ethanol and its metabolites in rat. *Alcohol*, 41, 87-93.
- Laizure, S.C., Mandrell, T., Gades, N.M., Parker, R.B. (2003).** Cocaethylene metabolism and interaction with cocaine and ethanol: role of carboxylesterases. *Drug Metab Dispos*, 31, 16-20.

- Lê, A.D., Kalant, H. (2017).** Intravenous self-administration of alcohol in rats – Problems with translation to human. *Addict Biol*, 22(6): 1665–1681. doi:10.1111/adb.12429.
- Leyton, M., Young, S.N., Blier, P., Baker, G.B., Pihl, R.O. & Benkelfat, C. (2000).** Acute Tyrosine Depletion and Alcohol Ingestion in Healthy Women. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(4), 459-464.
- Li, H., Li, C., Yana, Z.Y., Yang, J., Cheng, H. (2010).** Simultaneous monitoring multiple neurotransmitters and neuromodulators during cerebral ischemia
- Li, H. Lumeng, L., McBride, W.J., Waller, M.B. (1981).** Indiana selection studies on alcohol related behaviors. In *Development of Animal Models as Pharmacogenic Tools*. (ed. G.E. McClearn, R.A. Dietrich, V.G. Erwin) NIAAA Research Monograph Nº 6. US Department of Health and Human Services, Rockville, M.D., 171-191.
- Li, P. Yin, Y-L, Li, D., Kim, S.W., Wu, G. (2007).** Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, August-2007.
- Li, T.K., Iheorell, H. (1969).** Human liver alcohol dehydrogenase: inhibition by pyrazole and pyrazole analogs. *Acta Chem Stand*, 23, 892-902.
- Lieber, C.S., DeCarli, L.M. (1968).** Ethanol Oxidation by Hepatic Microsomes: Adaptive Increase after Ethanol Feeding. 162, 917-918.
- Lieber, C.S., DeCarli, L.M., Feinman, L., Hasumura, Y., Korsten, M., Matsuzaki, S., Teschke, R. (1975).** Effect of chronic alcohol consumption of ethanol and acetaldehyde metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 59, 185-227.
- Lizasoain, I., Moro, M.A., Lorenzo, P. (2002).** Cocaína: aspectos farmacológicos. *ADICCIONES*, 14(1), 57-64.
- Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, s., Jameson, J., Loscalzo, J. (2012).** *Harrison-Principios de Medicina Interna*. 18 edición. Editorial: McGraw-Hill, ISBN: 9786071507273.
- Lorenzo, M.P., Villaseñor, A., Ramamoorthy, A., Garcia, A. (2013).** Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: Application to bipolar disorder study. *Electrophoresis*, 34(11), <https://doi.org/10.1002/elps.201200632>
- /reperfusion in rats by microdialysis and capillary electrophoresis, 189( 2), 162-168.
- Lijequist, C.S., Engel, J. (1982).** Effects of GABAergic agonists and antagonists on various ethanol-induced behavioral changes. *Psychopharmacology*, 78(1), 71-75.
- Lindholm, S., Rosin, A., Dahlin, I., Georgieva, J., Francka, J. (2001).** Ethanol administration potentiates cocaine-induced dopamine levels in the rat nucleus accumbens. *Brain Research* 915, 176–184.

- Lobo, I.A., Harris, R.A. (2008).** GABA<sub>A</sub> receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav*, 90(1), 90–94. doi:10.1016/j.pbb.2008.03.006.
- Lu, L., Grimm J. W., Shaham Y. and Hope B. T. (2003).** Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine selfadministration in rats. *J Neurochem*, 85, 1604–1613.
- Lynch, W.L., Carroll, M.E. (1999).** Sex differences in the acquisition of intravenously self-administered cocaine and heroin in rat. *Psychopharmacology* (1999) 144:77–82.
- Lynch, W. J., Carroll, M. E. (2000).** Reinstatement of cocaine self-administration in rats: sex differences. *Psychopharmacology*, 148(2), 196-200.
- McCance-Katz, E.F. Price, L.H., McDougale, C.J., Kosten, T.R., Black, J.E. Jatlow, P.I. (1993).** Concurrent cocaine-ethanol ingestion in humans: pharmacology, physiology, behavior, and the role of cocaethylene. *Psychopharmacology*, 111, 39-46.
- Mansour, A., Fox, C.A., Thompson, R.C., Akil, H., Watson, S.J. (1994).** Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to  $\mu$ -receptor binding. *Brain Res*, 643, 245–265.
- Mardones, J., Segovia-Riquelme, N. (1983).** Thirty two years of selections of rats for etanol preference: Ucha and Uchb lines. *Neurobehavior, Toxicology and Teratology*, 5, 171-178.
- Masuo, Y., Imai, T., Shibato, J. et al. (2009).** Omic analyses unravels global molecular changes in the brain and liver of a rat model for chronic Sake (Japanese alcoholic beverage) intake. *Electrophoresis* 30(8), 1259–1275.
- Mayeux, R. (2004).** Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1, 182–188.
- Mayoral-Madriles, A., Cruz-Revilla, C., Vega-Manriquez., X., Aguirre-Hernández, R., Severiano-Pérez, P., Aburto-Arciniega, A., Jiménez-Mendoza, A. and Guevara-Guzmán, R. (2012).** Plasma Amino Acid Levels Discriminate Between Control Subjects and Mildly Depressed Elderly Women, 12, 167-172.
- Mckay, J.R., Ahernan, A.I., Rutherford, M.J., Cacciola, J.S., Mclellan, A.I. (1999).** The relationship of alcohol use to cocaine relapse in cocaine dependent patients in an aftercare study. *Journal of Studies in Alcohol*, 60, 176-180.
- McKee, B.L., Meshul, C.K. (2005).** Time-dependent changes in extracellular glutamate in the rat dorsolateral striatum following a single cocaine injection. *Neuroscience* 2005;133:605–13.
- McTavish, S.F., Raumann, B., Cowen, P.J., Sharp, T. (2001).** Tyrosine depletion attenuates the behavioural stimulant effects of amphetamine and cocaine in rats. *Eur J Pharmacol*, 20, 115-119.
- Meisch, R.A. (2001).** Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. *Alcohol*, 24(2), 117-128.

- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., Langosch, D., (1995).** Identification of a Gephyrin Binding Motif on the Glycine Receptor  $\alpha$  Subunit. *Neuron*, 15, 563-572.
- Miguens, M., Crespo, J.A., Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Montoya, G., García-Lecumberri, C., Ambrosio, E. (2008).** Differential cocaine-induced modulation of glutamate and dopamine transporters alter contingent and non-contingent administration. *Neuropharmacology*, 55, 771
- Nagy, J., Kolok, S., Boros, A., Dezso, P. (2005).** Role of altered structure and function of NMDA receptors in development of alcohol dependence. *Current Neuropharmacol*, 3, 281–29.
- Naylor S. (2003).** Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn* 3:525–9.
- Nestler, E.J. (2005).** The Neurobiology of Cocaine Addiction. *Science & Practice Perspectives*, 4-10.
- Nicholas PC, Kim D, Crews FT, (2008).** Macdonald JM. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic analysis of liver, serum, and brain following ethanol administration in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 21(2), 408–420 (2008).
- Nutt, D. (1999).** Alcohol and the brain: pharmacological insights for psychiatrists. *British Journal of Psychiatry*, 175, 114-119.
- Observatorio Español de la Drogas y las Adicciones (2018).** Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España, EDADES 2017. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2018),** Informe Europeo sobre Drogas 2018: Tendencias y novedades, Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo.
- Olive, M.F. (2002).** Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system Review Article M. F. Olive. *Amino Acids*, 23, 345–357. DOI 10.1007/s00726-002-0203-1
- Olszewski, D., Matias, J., Monshouwer, K. and Kokkevi, A. (2010).** Polydrug use among 15- to 16-year olds: similarities and differences in Europe, *Drugs: Education, Prevention, and Policy*, 17, (4), 287-302.
- Pacher, P., Batkai, S., Kunos, G. (2006).** The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58, 389-462.
- Palmour, R.M., Ervin, F.R., Baker, G.B., Young, S. N. (1998).** An amino acid mixture deficient in phenylalanine and tyrosine reduces cerebrospinal fluid catecholamine metabolites and alcohol consumption in vervet monkeys. *Psychopharmacology*, 136, 1-7.
- Pan, W. J., Hedaya, M. A. (1999a).** Cocaine and alcohol interactions in the rat: contribution of cocaine metabolites to the pharmacological effects. *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(4), 468-474.

- Pan, W. and Hedaya, M.A. (1999b).** Cocaine and Alcohol Interactions in the Rat: Alcohol Pretreatments on Cocaine Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceuticals Sciences*, 88, 459-467.
- Pan, W. and Hedaya, M.A. (1999c).** Cocaine and Alcohol Interactions in the Rat: effect on Cocaine Pharmacokinetics and. *Journal of Pharmaceuticals Sciences*, 98(12), 1266-1274.
- Pandey, S.C., Piano, M.R., Schwertz, D.W., Davis, J.M., Pandey, G.N. (1992).** Effect of Ethanol Administration and Withdrawal on Serotonin Receptor Subtypes and Receptor-Mediated Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Brain. *Alcoholism: Clínica and Experimental Research*, 16,(6), 110-116.
- Patkar, A.A., Rozen, S., Mannelli, P., Matson, W. Pae, C.U. (2009).** Krishnan, R.Kaddurah-Daouk, Alterations in tryptophan and purine metabolism incocaine addiction: a metabolomics study, *Psychopharmacology (Berl.)*, 206, 479–489.
- Paxinos, G., Watson, C. (2007).** The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Acad Press; 2007.
- Pennings, J.M., Leccese, A.P. & Wolf, F.A. (2002).** Effects of concurrent use of alcohol and cocaine. *Addiction*, 97, 773-783.
- Perez-Reyes, M., Jeffcoat, A.R. (1992).** Ethanol/cocaine interaction: cocaine and cocaethylene plasma concentration and their relationship to subjective and cardiovascular effects. *Life Sciences*, 51, 553-563.
- Perry, A. N., Westenbroek, C., Becker, J. B. (2016).** Sex Differences and Addiction. *Sex Differences in the Central Nervous System*, 129–147. doi:10.1016/b978-0-12-802114-9.00006-8
- Pickens, R., Thompson, T. (1968).** Cocaine-reinforced behavior in rats: effects of reinforcement magnitude and fixed-ratio. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 161(1), 122-129.
- Pierce, R.C., Bell, K., Duffy, P., Kalivas, P.W. (1996).** Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci*, 1996, 16, 1550–1560.
- Pinela, C., Coxam, V., Mignona, M., Taillandier, D., Cubizollesb, C., Lebecquea, P., Darmaun, D., Meynial-Denis, D. (2006).** Alterations in glutamine synthetase activity in rat skeletal muscle are associated with advanced age *Nutrition*, 22, 778–785.
- Phillips, K., Luk, A., Soor, G.S., Abraham, J.R., Leong, S., Butany, J. (2009).** Cocaine Cardiotoxicity. A review of the Pathophysiology, Pathology and Treatment Options. *Am J Cardivac Drugs*, 9(3), 177-196.
- Piomelli D. (2003).** The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4, 873–884.



- Qiu, Z., Morgan, J.P. (1993).** Differential effects of cocaine and cocaethylene on intracellular  $Ca^{2+}$  and myocardial contraction in cardiac myocytes. *Br. J. Pharmacology*, 109, 293-298.
- Quinn, D.I., Wodak, A., Day, R.O. (1997).** Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles of Illicit Drug Use and Treatment of Illicit Drug Users. *Clin Pharmacokinet*, 33(5), 344-400.
- Rafia, F.K. & Epstein, R.L. (1979).** Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol. *J Anal Toxicol*, 3, 59-63.
- Randall, T. (1992).** Cocaine, Alcohol Mix in Body to Form Even Longer Lasting, More Lethal Drug. *JAMA*, 267(8), 1043-1044.
- Ravaglia, S., Costa, A., Ratti, M.T., Savoldi, F., Moglia, B.P. (2002).** Cognitive impairment and central motor conduction time in chronic alcoholics. *Funct Neurol*, 17:83-86.
- Rehm, J., Taylor, B., Mohapatra, S., Irving, H., Baliunas, D., Patra, J., Roerecke, M., (2010).** Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis. *Drug and Alcohol Review*, 29, 437-445.
- Roberts, S.M., Harbison, R.D., James, R.C. (1993).** Inhibition by ethanol of the metabolism of cocaine to benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in mouse and human liver. *Drug Metab Disp*, 21(3), 537-541.
- Robosky, L.C., Robertson, D.G., Baker, J.D., Rane, S. & Reily, M.D. (2002).** In vivo toxicity screening programs using metabonomics. *Comb Chem High Throughput Screen* 5,651-662.
- Rodríguez-Jiménez R., Ponce G., Jiménez-Arriero M.A., Bagney A., Cubillo A.I., Aragües M., Rubio G., Palomo T. (2006).** Bases psicobiológicas de la adicción a cocaína. *REVISTA ESPAÑOLA DE DROGODEPENDENCIA*, 1(3, 4), 311-323.
- Roth, M. E., Cosgrove, K. P., & Carroll, M. E. (2004).** Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(6), 533-546.
- Rothman, R.B., Baumann, M.H. (2003).** Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol*, 479(1-3), 23-40.
- Rounsaville, B.J., Petry, N.M., Carroll, K.M. (2003).** Single versus multiple drug focus in substance abuse clinical trials research. *Drug Alcohol Depend*, 70, 117-125.
- Roy A. (2001).** Characteristics of Cocaine-Dependent Patients Who Attempt Suicide. *Am J Psychiatry*, 158, 1215-1219.
- Roura-Martínez, D., Ucha, M., Orihuel, J., Ballesteros-Yáñez, Castillo, C.A. Marcos, A., Ambrosio, E., Higuera-Matas, A. (2018).** Central nucleus of the amygdala as a common substrate of the incubation of drug and natural reinforcer seeking. *Addiction Biology*, 1-12. DOI: 10.1111/adb.12706.
- Sánchez-López, E., Marcos, A., Ambrosio, E., Mayboroda, O. A., Marina, M. L., & Crego, A. L. (2017).** Investigation on the combined effect of cocaine and ethanol administration through a



liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 140, 313-321.

**Sanchis-Segura C, Spanagel R. (2006).** Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol*, 11(1), 2-38.

**Salloum, I.M., Daley, D.C., Cornelius, J.R., Kirisci, L., Thase, M.E. (1996).** Disproportionate lethality in psychiatric patients with concurrent alcohol and cocaine abuse. *Am J Psychiatry*, 153(7), 953-955.

**Schechter, M. D., and Meehan, S.M. (1995).** The Letal Effects of Etanol and Cocaine and Their Combination in Mice: Implications for Cocaethylene Formation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(1), 245-248.

**Sibly, R.M., Peakall, D.B. (1996).** Biomarkers. In: Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM y Peakall DB (eds). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis , London, 175-194.

**Siegel, F.L., Roach, M.K., Pomeroy, L.R. (1964).** Plasma amino acids patterns in alcoholism: the effects of etanol loading. *Proc. N. A. S.*, 51, 605-611.

**Silbergeld, E.K., Davis, D.L. (1994).** Role of biomarkers in identifying and undestanding environmentally induced disease. *Clin Chem*, 40, 1363-1367.

**Shalev, U., Grimm, J. W., Shaham, Y. (2002)** Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: A review. *Pharmacological Reviews*, 54, 1-42.

**Sheng , M., y Kim, E. (2011).** The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

**Sheng, M., y Hoogenraad, C. (2007).** The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual review of biochemistry*, 823 - 47.

**Schenkel, L.C., Bakovic, M. (2014).** Formation and Regulation of Mitochondrial Membranes. *International Journal of Cell Biology*, 2014, 13p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/709828>

**Shuster, L., Casey, E., Welankiwar, S.S. (1983).** Metabolism of cocaine and norcocaine to N-hydroxynorcocaine. *Biochem Pharmacol*, 30, 777-783.

**Smith, J.A., Mo, Q., Guo, H., Kunko, P.M., Robinson, S.E. (1995).** Cocaine increases extraneuronal levels of aspartate and glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Res*, 683, 264–9.

**Smith, R.J. (1990).** Glutamine metabolism and its physiologic importance. *JPEN*, 14, 40S–416.

**Smith, S.G., Werner, T., Davi, W.M. (1976).** Comparison between intravenous and intragastric alcohol self-administration *Physiological Psychology*, 4 (1), 91-93.

**Soldin, O.P., Mattison, D.R. (2009).** Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*, 48(3), 143–157.

- Song BJ, Cederbaum AI. (1996).** Ethanol inducible cytochrome P450 (CYP2E1): Biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 Update. *Alcohol Clin Ex Res*, 20, 138-146.
- Sopeña, B., Rivera, A., Rodríguez-Domínguez, M., Rodríguez-Rodríguez, M., Argibay, A., Maure, B., Gimena, B., Martínez-Vázquez, C. (2008).** Complicaciones relacionadas con el consumo de cocaína que precisaron ingreso hospitalario. *Rev Clin Esp*, 208(1), 12-17.
- Soyka, M., Preuss, U.W., Hesselbrock, V., Zill, P., Koller, G., Bondy, B. (2008).** GABA-A2 receptor subunit gene (GABRA2) polymorphisms and risk for alcohol dependence. *Journal of Psychiatric Research*, 42, 184–191.
- Spanagel, R. (2017).** Animal models of addiction Rainer Spanagel, *Animal models of addiction. Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(3), 201.
- Spear, L. P. (2000).** Modeling Adolescent Development and Alcohol. *Alcohol Research and Health*, 24, 2.
- Spear, L. P. (2002).** The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *Journal of Studies on Alcohol, Supplement*, (14), 71-81.
- Spear, L.P., (2016).** Consequences of adolescent use of alcohol and other drugs: Studies using rodent models. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 228–243. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.07.026.
- Stafford, D., LeSage, M.G., Glowa, J.R. (1998).** Progressive-ratio schedules of drug delivery in the analysis of drug self-administration: a review. *Psychopharmacology*, 139, 169
- Stine, S.M., Kristal, J.H., Petrakis, I.L. Jatlow, P.I. Heninger, G.R., Kosten, T.R., & Chaney, D.S. (1997).** Effect of Alpha-Methyl-Para-Tyrosine on Response to Cocaine Challenge. *Biol Psychiatry*, 42, 181-190.
- Tabakoff, B., Hoffman, P.L. (2000).** Animal models in alcohol research. *Alcohol res Health*, 24, 77-84.
- Tamborelli Garcia, R. C., Mendonça Munhoz, L., Fukuda, C., Lobo Torres, L.H., Moura, S., Delazeri de Carvalho, N., Carneiro Carrettiero, D., Camarini, R., Levada-Pires, A.C., Yonamine, M., Negrini Neto, et al., (2012).** The neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. *Toxicological Sciences*.
- Tennant, F.S. Jr. (1985).** Effect of Cocaine Dependence on Plasma Phenylalanine and Tyrosine Levels and Urinary MHPG Excretion. *Am J Psychiatry*, 142, 1200-1201.
- Tsou, K. et al. (1998).** Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett*, 254, 137–140.
- Tsukamoto, S., Kanegae, T., Nagoya, T., Shimamura, M., Mieda, Y., Nomura, M., Hojo, K., Okubo, H. (1990).** Effects of amino acids on acute alcohol intoxication in mice--concentrations

of ethanol, acetaldehyde, acetate and acetone in blood and tissues. *Arukoru Kenkyuto Yakubutsu Ison*, 25(5), 429-40.

**Tzschentke TM. (2007).** Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 12(34):227-462.

**Ungless, M. A., Whistler, J. L., Malenka, R. C., and Bonci, A. (2001).** Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*, 411, 583–587. doi: 10.1038/35079077

**Van Huijstee, A.N., Mansvelder, H.D., (2015).** Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction, *Front Cell Neurosci*, 8, 466.

**Van Sickle M.D., Duncan M, Kingsley PJ, et al. (2005).** Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310, 329–332.

**Wilkinson, P., Van Dyke, C., Jatlow. P., Barash, P., Byck, R. (1980).** Intranasal and oral cocaine kinetics. *Clin Pharmacol Ther*, 27, 386-394.

**Wise, R.A. (1984),** Neural mechanisms of the reinforcing action of cocaine, in *Cocaine: Pharmacology, Effects and Treatment of Abuse*. Edited by Grabowski J. Washington, DC, National Institute on Drug Abuse.

**Weiss, R.D., Griffin, M.L., Mirin, S.M. (1989).** Diagnosing Major Depression in Cocaine Abusers: The Use of Depression Rating Scales. *Psyttatry Research*, 28, 335-343.

**Weiss, F., Lorang, M.T., Bloom, F.E., Koob, G.F. (1993).** Oral Alcohol Self-Administration Stimulates Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens Genetic and Motivational Determinants. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 267(1), 250-267.

**Weiss, F., Markou, A., Lorang, M.T., Koob, G.F. (1992).** Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain Res* 1992; 593: 314-8.

**Winger, G., Galuska, C.M., Hursh, S.R. (2007).** Modification of ethanol's reinforcing effectiveness in rhesus monkeys by cocaine, flunitrazepam, or gamma-hydroxybutyrate *Psychopharmacology*, 193, 587–598.

**Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wolf, A.P., Schlyer, D., Shiue, C.Y., Alpert, R., Dewley, S.L., Logan, J., Bendriem, B., Christman, D., et al., (1990).** Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *Am J Psychiatry*, 147, 719-724.

**Wurtman, R.J., Heptl, F., Melamed, E. (1981).** Precursor Control of Neurotransmitter Synthesis *Pharmacological Reviews*, 22(4), 315-335.

**Wyatt, R.J., Karoum, F., Suddath, R. (1998).** Persistently decreased brain dopamine levels and cocaine. 27, 2996.

- Xi, Z.X., Ramamoorthy, S., Shen, H., Lake, R., Samuvel, D.J., Kalivas, P.W. (2003).** GABA Transmission in the Nucleus Accumbens Is Altered after Withdrawal from Repeated Cocaine. *The Journal of Neuroscience*, 23(8), 3498–3505.
- Xiang, Y., Kim, K., Gelernter, J., Park, I., Zhang, H. (2015).** Ethanol Upregulates NMDA Receptor Subunit Gene Expression in Human Embryonic Stem Cell-Derived Cortical Neurons. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0134907.
- Yao, W.D., Gainetdinov, R.R., Arbuckle, M.I., Sotnikova, T.D., Cyr, M., Beaulieu, J.M., Torres, G.E., Grant, S.G.N., Caron, M.G. (2004).** Identification of PSD-95 as a Regulator of Dopamine-Mediated Synaptic and Behavioral Plasticity. *Identification of PSD-95 as a Regulator of Dopamine-Mediated Synaptic and Behavioral Plasticity. Neuron*, 41, 625–638.
- Zaitsu, K., Hayashi, Y., Kusano, M., Tsuchihashi, H., Ishii, A. (2016).** Application of metabolomics to toxicology of drugs of abuse: A mini review of metabolomics approach to acute and chronic toxicity studies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 31, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2015.10.002>
- Zaitsu, K., Miyawaki, I., Bando, K., et al. (2014).** Metabolic profiling of urine and blood plasma in rat models of drug addiction on the basis of morphine, methamphetamine, and cocaine-induced conditioned place preference. *Anal Bioanal Chem*, 406, 1339–54. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7234-1>
- Zavala, M., Castejón, H.V., Ortega, Castejón, O.J., Marcano de Hidalgo, A., & Montiel, N. (2001).** Desequilibrio de aminoácidos plasmáticos en pacientes autistas y en sujetos con trastorno de déficit de atención o hiperactividad. *Revista de Neurología*, 33(5), 401-407.
- Zielke, H.R., Zielke, C.L., Baab, P.J. (2009).** Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis. *J Neurochem*, 109(1), 24–29.
- Zuo, L., Kranzler, H.R., Luo, X., Covault, J., Gelernter, J. (2007).** CNR1 variation modulates risk for drug and alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 62: 616–626.
- Zuo, L., Kranzler, H.R., Luo, X., Yang, B-Z., Weiss, R., Brady, K., Poling, J., Farrer, L., Gelernter, J. (2009).** Interaction between Two Independent CNR1 Variants Increases Risk for Cocaine Dependence in European Americans: A Replication Study in Family-Based Sample and Population-Based Sample. *Neuropsychopharmacology*, 34, 1504–1513.